

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

**ASSOCIAÇÃO ENTRE ENCURTAMENTO TELOMÉRICO E INFECÇÃO
POR CITOMEGALOVÍRUS NO TRANSTORNO BIPOLAR DO TIPO I**

Porto Alegre

2012

**ASSOCIAÇÃO ENTRE ENCURTAMENTO TELOMÉRICO E INFECÇÃO
POR CITOMEGALOVÍRUS NO TRANSTORNO BIPOLAR DO TIPO I**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Autor: Lucas Bortolotto Rizzo

Orientador: Moisés Evandro Bauer

Área de atuação: Imunologia

Porto Alegre

2012

Este trabalho é dedicado à minha família por acreditar
em mim nos momentos em que duvidei.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer profundamente aos meus pais, Elisabeth e Volcimar, e ao meu irmão Arthur. O apoio e a compreensão de vocês foi essencial para esta conquista. Um mero “muito obrigado” é capaz de expressar a gratidão que sinto.

Ao meu orientador, Moisés Bauer, pela disponibilidade, paciência e confiança em mim deposita. Agradeço também pelos ensinamentos, que carregarei para sempre.

À colega e praticamente irmã, Carine Prado, muito obrigado por “esta parceria que deu muito certo”, como tu mesma disseste. Aprendi muito contigo, principalmente sobre como levar a vida.

À “minha doutoranda” Andréa Wieck, pelos ensinamentos, pelas discussões científicas e por mostrar que diversão e trabalho combinam. Muito obrigado.

Aos meus amigos - Eduardo, Samuel, Paulo, Arthur e Miguel - também faço uma saudação especial. A nossa amizade - com suas inúmeras noites ao embalo de conversas, cantorias e rizadas - foi importantíssima para de manter a sanidade durante o curso de toda a graduação.

Muito obrigado também aos demais colegas dos Laboratórios de Imunologia do Envelhecimento e Imunologia Celular e Molecular da PUCRS que contribuíram com seu companheirismo, discussões científicas e com muitas rizadas: Talita, Laura, Júlia, Ágatha, Rafael, Thiago, Zanin, Taiane, Ana e Bárbara.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela minha graduação.

Às agências de financiamento - Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) - por possibilitarem a realização deste trabalho.

Lista de Figuras

Figura 1 Pag. 7

Figura 2 Pag. 9

Figura 3 Pag. 11

Figura 4 Pag. 12

Figura 5 Pag. 37

Lista de Abreviações

TB	Transtorno Bipolar
CT	Comprimento telomérico
CMV	Citomegalovírus
CID-10	Classificação internacional de Doenças (10 ^a Rev.)
DSM-IV	Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (4 ^a Ed.)
HPA	Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal
OMS	Organização Mundial da Saúde
IL	Interleucina
TNF α	Fator de Necrose Tumoral α
IFN γ	Interferon γ

Resumo

Introdução: O Transtorno Bipolar (TB) tem sido associado com um processo inflamatório e senescência celular precoce, evidenciado pelo menor comprimento telomérico (CT). O citomegalovírus humano (CMV) promove uma infecção assintomática latente em adultos imunocompetentes. Estudos sobre envelhecimento vêm relacionando a infecção por CMV a aceleração do processo de imunossenescência. Neste estudo, investigamos a sorologia para CMV e sua relação com marcadores de senescência celular, subtipos celulares e CT, no transtorno bipolar do tipo 1.

Métodos: Células mononucleares do sangue periférico e DNA genômico foram isolados e o CT foi mensurado via PCR tempo real em vinte e quatro pacientes do sexo feminino com TB do tipo 1 eutímicas e dezessete controles pareadas por idade e sexo. A sorologia para IgM e IgG contra CMV foi avaliada por meio de ensaio de quimioluminescência. Foi utilizada citometria de fluxo para imunofenotipar os subtipos linfocitários (T, NK, NKT e CD8+CD28-).

Resultados: Pacientes com TB apresentaram CT encurtado e níveis aumentados de CMV-IgG (todos $p < 0,01$). Nenhum dos pacientes e controles apresentou níveis significativos de IgM-CMV, excluindo infecção viral aguda. Os níveis de CMV-IgG foram associados com a expansão de células T senescentes (CD8CD28-) e com células NK, envolvidas no controle viral.

Conclusões: Os dados contribuem para a hipótese de envelhecimento acelerado no TB, como sugere a expansão de células T senescentes e os telômeros encurtados. Este estudo também indica que a infecção por CMV pode ser uma força capaz de direcionar o TB a uma imunossenescência precoce.

Palavras-chave: Telômeros, Transtorno Bipolar, Citomegalovírus, Imunossenescência, Linfócitos.

Sumário

Lista de Figuras	V
Lista de Abreviações.....	VI
Resumo.....	VII
1. Introdução	1
1.1. Transtorno Bipolar.....	1
1.1.1. Caracterização.....	1
1.1.2. Epidemiologia	3
1.1.3. Etiologia e Patofisiologia	5
1.1.4. Tratamento	7
1.2. Envelhecimento	8
1.2.1. Telômeros.....	8
1.2.2. Imunossenescência	11
1.2.2.1. Células CD8+CD28-.....	12
1.2.2.2. Citomegalovírus	14
2. Artigo Científico	16
2.1. Abstract	17
2.2. Introduction.....	18
2.3. Methods	19
2.3.1. Subjects	19
2.3.2. Blood collection and cell isolation.....	20
2.3.3. Immunophenotyping	20
2.3.4. CMV serology	21
2.3.5. Telomere length (TL) assessment.....	21
2.3.6. Statistical analysis.....	23
2.4. Results	23
2.4.1. Clinical parameters and CMV serology	23
2.4.2. Telomere length (TL)	24
2.4.3. Relationships between CMV serology and lymphocytes	24
2.5. Discussion	24
2.6. Acknowledgments	28
2.7. Financial disclosures.....	28
2.8. References	28

3. Conclusões e perspectivas	36
4. Referências.....	38

1. Introdução

1.1. Transtorno Bipolar

O Transtorno Bipolar (TB) é um transtorno de humor com uma sintomatologia complexa e de etiologia multifatorial, na qual fatores biológicos e ambientais, dentre eles psicossociais, interagem em diversos níveis. Mesmo tendo sido descrito há longo tempo, a etiologia deste transtorno continua obscura. A ausência de marcadores biológicos específicos para o TB é um dos grandes entraves para o correto diagnóstico e tratamento do transtorno. Ainda existem casos em que o TB não é diagnosticado em tempo hábil para um tratamento adequado ou mesmo de forma correta, sendo comum um diagnóstico inicial de depressão unipolar ou esquizofrenia (1). O TB é uma doença crônica, progressiva, altamente debilitante e cuja prevalência (aproximadamente 2,4% da população mundial) supera a de outros problemas de saúde, como o HIV (0,8%, OMS 2010). Dessa forma, estudos envolvendo a etiologia e patofisiologia desta doença são de grande importância para a sociedade.

1.1.1. Caracterização

Segundo a 10ª revisão da Classificação internacional de Doenças (CID-10), elaborado pela Organização Mundial de Saúde (OMS), o Transtorno Afetivo Bipolar ou Transtorno Bipolar é classificado como um transtorno de humor. O TB é caracterizado quando do aparecimento de dois ou mais episódios nos quais o humor e o nível de atividade do sujeito estão profundamente perturbados, sendo que este distúrbio consiste em ocasiões de elevação de humor e aumento da energia e da atividade (hipomania ou

mania) e em outras ocasiões de um rebaixamento do humor e de redução da energia e da atividade (depressão)(2). Estes períodos de alteração no humor podem, ou não, serem intercalados por períodos de normalização do humor (eutimia ou remissão). Usualmente, a eutimia é - do ponto de vista operacional - definida como o estado em que o paciente não preenche critérios para episódio maníaco, hipomaníaco ou depressivo. Já a remissão implica no indivíduo manter o estado de eutimia, a ponto de a doença ser considerada sob controle.

Um episódio hipomaníaco é definido como um período em que ocorre moderada elevação do humor, aumento da energia, atividade, sociabilidade e energia sexual e diminuição da necessidade de dormir. As alterações de humor e comportamento não são acompanhadas de alucinações. O episódio maníaco apresenta sintomas semelhantes, mas ainda mais salientes. Dificuldade em manter a atenção, fugacidade do pensamento, excesso de confiança e ideias de grandiosidade são comuns e podem levar a comportamentos imprudentes. O episódio maníaco pode ou não ser acompanhado de sintomas psicóticos. O episódio depressivo é caracterizado por um rebaixamento no humor, redução na energia e diminuição da atividade. Baixa autoestima e autoconfiança, bem como ideias de culpa e inutilidade são comuns. Ocorrem alterações no sono, redução no apetite e cansaço ao mínimo esforço. Dependendo do grau de depressão pode haver também ideário suicida (2).

O TB pode ser classificado primariamente em duas formas distintas, tipo I e tipo II, de acordo com o Manual Diagnóstico e Estatístico de

Transtornos Mentais, 4ª edição (DSM-IV)(3). O TB tipo I é caracterizado pela ocorrência de ao menos um episódios maníaco. O TB tipo II inclui ao menos um episódio hipomaníaco e ausência de episódios maníacos ou mistos. Ambos os pacientes com TB tipo I e tipo II podem apresentar episódios depressivos ao longo do curso do transtorno (4). Os episódios são de diferente gravidade, frequência e duração, e o episódio misto ocorre quando o paciente preenche simultaneamente os critérios diagnósticos para episódio maníaco e episódio depressivo (5).

1.1.2. Epidemiologia

A prevalência do TB é de cerca de 2,4% na população mundial, no entanto há grandes diferenças entre países (6). A prevalência do TB tipo I é de aproximadamente 0,6% e parece ser mais prevalente no sexo masculino. Já o TB tipo II afeta 0,4% da população mundial, sendo mais prevalente no sexo feminino (6-8). A manifestação dos primeiros sintomas ocorre em sua maioria durante a adolescência e início da maior idade(6, 9), levando entre 5-10 anos para a realização do primeiro tratamento ou hospitalização(10).

Diversos estudos vêm demonstrando que o TB está associado a comorbidades psiquiátricas e médicas, o que pode complicar o diagnóstico, o andamento e o tratamento do transtorno (11). Em um estudo recente, Merikangas et al. mostrou que aproximadamente 75% dos pacientes com TB apresentavam alguma comorbidade psiquiátrica, sendo que mais de 40% dos afetados apresentavam três ou mais transtornos psiquiátricos(6). Os transtornos associados mais comuns são transtornos de ansiedade, como ataques de pânico, e uso de substâncias, notadamente abuso de álcool (6,

12-14). Dentre as comorbidades médicas, as mais prevalentes são doenças cardiovasculares, diabetes do tipo II e obesidade (4, 14-16).

A sintomatologia do TB, bem como suas comorbidades associadas, determina um prejuízo na capacidade de o indivíduo realizar seu papel funcional. Ambos os episódios maníacos e depressivos podem ser responsáveis pelo prejuízo funcional, 75-87% dos pacientes relataram um comprometimento severo no desempenho de seus papéis durante episódios depressivos, enquanto isso 50-57% dos pacientes relataram que já experimentaram algum comprometimento funcional durante episódios maníacos (6, 17).

Além disso, o TB também está associado a maiores taxas de mortalidade por causas “naturais” (doenças cardiovasculares, doença cerebrovascular, diabetes) e “não–naturais” (suicídio, homicídio e acidentes). A taxa de mortalidade por suicídio em pacientes com TB é 15 vezes maior que a taxa esperada na população em geral para homens e de aproximadamente 23 vezes maior nas mulheres (18), ocorrendo principalmente durante a fase depressiva (19).

O TB é um transtorno incapacitante que gera diversos prejuízos sociais e médicos ao paciente, bem como aos familiares e cuidadores. Além disso, gera um alto custo à sociedade e ao Estado, na geração de cuidados pelos programas de saúde (20), dessa forma o estudo da etiologia e patofisiologia do Transtorno Bipolar são de grande importância para a sociedade.

1.1.3. Etiologia e Patofisiologia

Por mais de quatro décadas, as bases biológicas dos transtornos de humor têm sido explicadas por meio da hipótese monoaminérgica (21-23). Essa teoria propõe que os sintomas psiquiátricos sejam consequência de uma menor disponibilidade de aminas biogênicas cerebrais, em particular de serotonina, noradrenalina e/ou dopamina (24). Tal proposição é reforçada pelo conhecimento do mecanismo de ação dos antidepressivos, que se baseia, principalmente, no aumento da disponibilidade desses neurotransmissores na fenda sináptica, seja pela inibição (seletiva ou não) de suas recaptações, seja pela inibição da enzima responsável por suas degradações (inibidores da monoaminoxidase). A hipótese monoaminérgica pode explicar parte das alterações encontradas na depressão maior e no TB, no entanto apresenta falhas em explicar porque aproximadamente 30% dos pacientes em episódio não respondem aos medicamentos (25), evidenciando que outros sistemas biológicos podem estar envolvidos. Uma das hipóteses crescentes é que o sistema imunológico possa estar envolvido na patofisiologia do TB.

O TB é acompanhado de múltiplos sinais de ativação e alterações do sistema imunológico (26, 27), variando de acordo com a fase em que o paciente se encontra (mania, depressão ou eutimia) (28). Existem algumas evidências sugerindo que o sistema imune, em interação direta com o sistema nervoso central, possui papel importante na patofisiologia do TB (28, 29). Citocinas podem exercer profundos efeitos no SNC e no sistema endócrino alterando o metabolismo central das monoaminas, que são

moléculas sintetizadas no cérebro a partir de seus aminoácidos precursores triptofano e tirosina (30, 31). As modificações comportamentais induzidas pelas citocinas estão associadas a alterações no metabolismo da serotonina, norepinefrina e dopamina em regiões do cérebro essenciais para regulação das emoções e da função psicomotora. Marcadores inflamatórios como IL-1, IL-6 e INF-alfa podem alterar vias enzimáticas associadas com o metabolismo das monoaminas, como a **IDO** (indolamina-2,3-dioxigenase). Quando ativada, a IDO é capaz de metabolizar o triptofano em quinurenina, resultando na diminuição da síntese de serotonina. Curiosamente, pacientes infectados pelo vírus da hepatite C submetidos à terapia com INF α apresentaram uma diminuição nos níveis de triptofano e aumento de quinurenina, concomitantes com o desenvolvimento de sintomas depressivos (31). Citocinas podem ainda induzir a liberação de glutamato por astrócitos e reduzir a expressão de transportadores de glutamato, reduzindo a recaptação glutamatérgica. O glutamato liberado por astrócitos tem acesso preferencialmente a receptores extrasinápticos NMDA (N-metil D-Aspartato) que irão reduzir a expressão de BDNF e suporte neurotrófico, e conseqüentemente aumentar a susceptibilidade neuronal ao estresse oxidativo (25) (Fig. 1).

Dessa forma, diferentes teorias vêm sendo compostas ao longo dos anos com o intuito de integrar esses conhecimentos. Atualmente existem três teorias para a etiologia e progressão do TB: A teoria da Neuroprogressão, da Carga Alostática e do Envelhecimento Acelerado. Esta

última teoria foi explorada neste trabalho e suas bases científicas serão detalhadas a seguir.

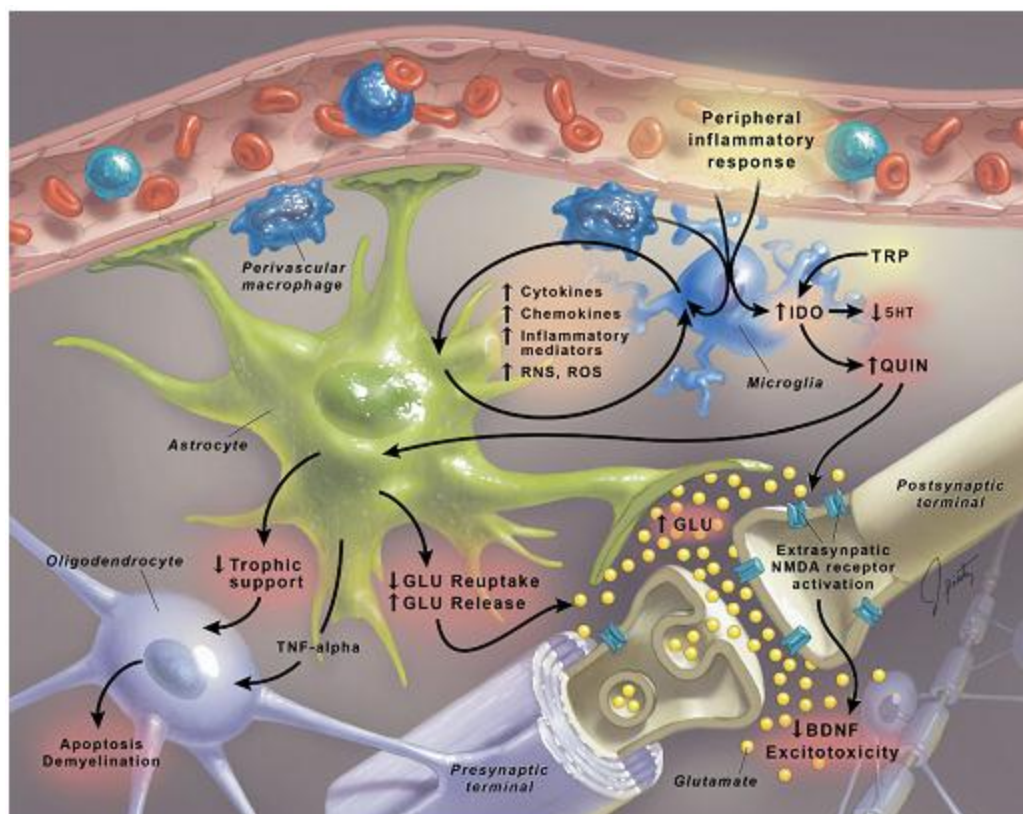


Fig. 1. Efeitos da inflamação periférica na plasticidade e produção de monoaminas no sistema nervoso central. Retirado de Miller, A. H. 2009

1.1.4. Tratamento

O tratamento de indivíduos com TB envolve estratégias distintas nas diferentes fases da doença: mania, depressão e eutímia, e objetiva a manutenção das mudanças de humor e a redução da frequência das passagens entre as crises de mania e os estados depressivos. Uma variedade de medicamentos é atualmente aprovada pelo *Food and Drug Administration* (FDA), a agência americana responsável pelo controle de

medicamentos e alimentos, incluindo o lítio, carbamazepina e ácido valpróico, além de anticonvulsivantes e antipsicóticos atípicos (32, 33). Para o tratamento de mania, são utilizados lítio, carbamazepina e clorpromazina, juntamente com antipsicóticos atípicos. Para a fase depressiva da doença, foi aprovada apenas a combinação olanzapina-fluoxetina e a quetiapina (34). Existe controvérsia sobre o uso de antidepressivos em pacientes bipolares, não apenas pelo aumento no risco de indução de mania, mas também devido à sua eficácia questionável. Os estabilizadores de humor são compostos utilizados muitas vezes com antidepressivos para manter a eutímia em pacientes e evitar um episódio de mania ou depressão.

1.2. Envelhecimento

Envelhecimento pode ser definido como um declínio progressivo da função dos tecidos que culmina na mortalidade do indivíduo. Esse declínio funcional pode ser oriundo da perda ou diminuição da função das células ou na falha em repor estas células por um declínio na habilidade das células tronco em manter o *turnover* celular. O envelhecimento é um processo natural, não sendo considerado uma doença (35). Nesta sessão, serão apresentados os fenômenos biológicos imunossenescência, comprimento telomérico (CT) e infecção por citomegalovírus (CMV) e suas relações com o envelhecimento.

1.2.1. Telômeros

Telômeros são estruturas presentes nas extremidades dos cromossomos e são compostos de DNA e proteínas. O elemento de DNA presente nos telômeros é composto de repetições sucessivas (em *tandem*)

da sequência $(TTAGGG/CCCTAA)_n$ (36) enquanto o elemento proteico é composto por diversas proteínas - como TRFs, POT, TIN2 – que estabilizam a região (37, 38). O DNA telomérico apresenta normalmente entre 5 e 15 kilobases (kb), podendo variar entre os tecidos, a idade do indivíduo e a história replicativa da célula. Normalmente o final da região telomérica termina em uma região 3' simples fita com aproximadamente 50 a 300 nucleotídeos, gerando uma estrutura em laço (*T-loop*) (Fig. 2) (39). Acredita-se que os telômeros tenham surgido na evolução como uma forma de evitar que os cromossomos lineares fossem confundidos pela maquinaria de reparo ao DNA com quebras duplas protegendo-os de degradação e fusões. De fato, a perda da região telomérica por mutações na enzima capaz de

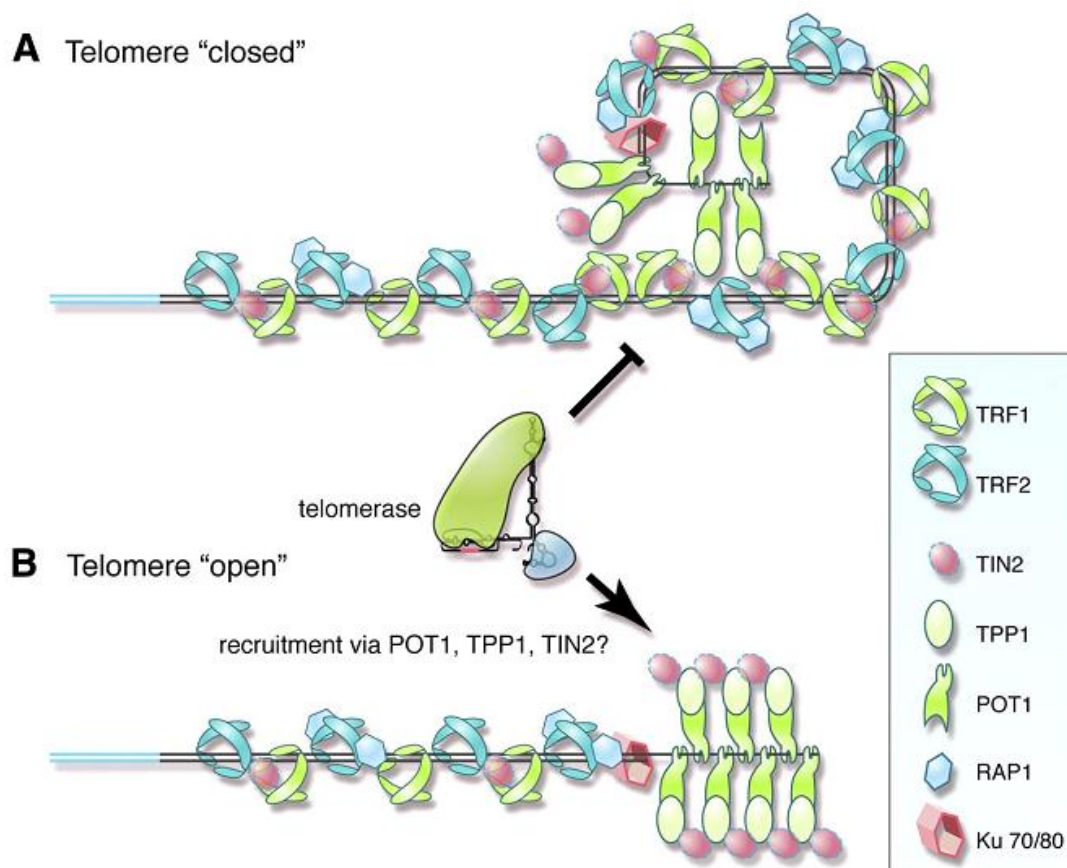


Fig. 2. Estrutura da região telomérica, suas conformações “fechada” em (A) e “aberta” em (B) e enzima telomerase. Retirado de Aubert, G. 2008

repor o DNA telomérico (telomerase) gera instabilidade cromossômica (40).

A cada processo de replicação celular, o DNA telomérico sofre uma redução de aproximadamente 100 a 200 nucleotídeos. Isso se deve ao “problema do final da replicação” da fita descontínua do DNA (3' → 5'). A forquilha de replicação - ao chegar à extremidade do cromossomo - não encontra DNA suficiente para gerar a alça de replicação e inserir o *primer* necessário para gerar o último fragmento de Okasaki, gerando perdas no DNA (41). Entre outras causas para o atritamento da região telomérica estão o estresse oxidativo e o processamento das extremidades cromossômicas após a replicação (42, 43). Quando os telômeros atingem níveis críticos de encurtamento, induzem um processo de sinalização para parada no ciclo celular, fazendo com que a célula entre em um processo de “senescência celular” (35). Este fato levou a hipótese de que o comprimento telomérico pudesse servir como um “relógio biológico” da vida celular. Contribuindo para esta hipótese, há um marcante encurtamento telomérico ao longo dos anos (Fig. 3).

Um dos mecanismos para compensar o encurtamento telomérico é a expressão da enzima telomerase. A telomerase é uma proteína do tipo transcriptase reversa capaz de estender o comprimento telomérico por adicionar TTAGGGs à região 3' telomérica. A maior parte das células somáticas reprime a expressão desta enzima a nível transcricional, sendo sua atividade restrita a células durante a embriogênese, células germinativas, células tronco adultas e células imunes ativadas (44-46).

Recentemente, alguns estudos analisaram o comprimento telomérico em pacientes com transtornos de humor, encontrando evidências para envelhecimento acelerado no transtorno bipolar (47, 48) e depressão maior(47, 49). No entanto, os mecanismos envolvidos no encurtamento telomérico em transtornos de humor ainda não são completamente compreendidos.

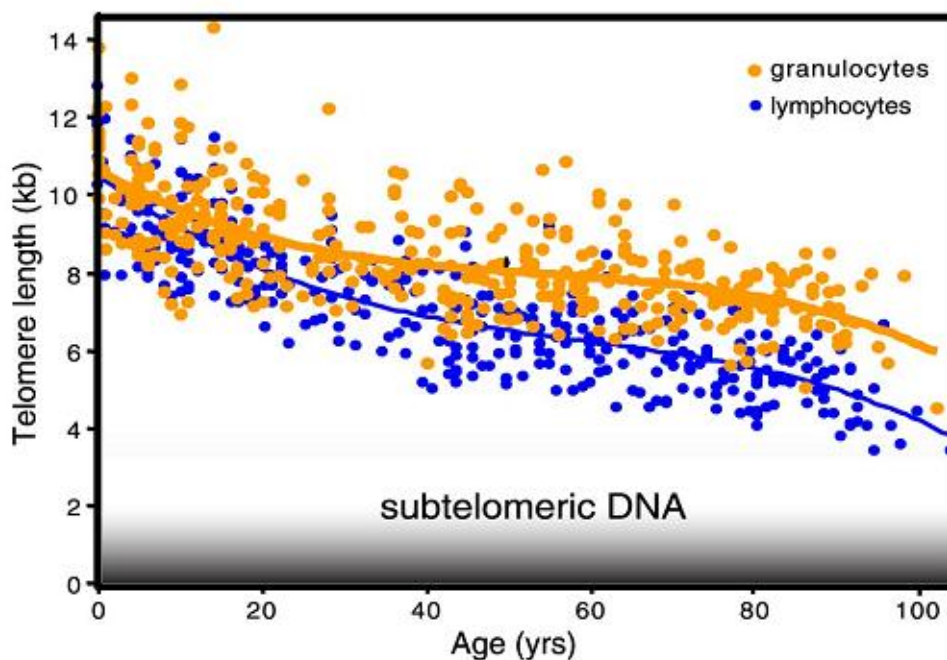


Fig. 3. Comprimento telomérico em células mononucleares isoladas de sangue periférico (PBMCs) ao longo da idade. *Retirado de Aubert, G. 2008*

1.2.2. Imunossenescência

“Imunossenescência” se refere ao declínio e remodelamento da função imunológica que ocorre com o avanço da idade. Durante esse processo, a imunidade inata parece ser de certa forma mantida, enquanto a adquirida parece ser severamente afetada (50, 51).

1.2.2.1. Células CD8+CD28-

Uma das grandes marcas do processo de imunossenescência é o aparecimento progressivo de linfócitos T citotóxicos que deixam de expressar a molécula CD28 (CD8+CD28-) (52). A molécula CD28 é a principal responsável pelo sinal coestimulatório necessário para indução da sobrevivência, proliferação e ativação das células imunológicas, assim a perda de CD28 gera profundas alterações funcionais nestas células (53). O acúmulo de células CD28- progride com o avanço da idade. Indivíduos jovens apresentam cerca de 10% de células CD8+CD28-, a proporção cresce significativamente em idosos (65 anos) se tornando 95% da população CD8+ (52, 54, 55).

As células CD8+CD28- foram primeiramente descritas como células que, após diversos ciclos de proliferação, entram em um processo de parada no ciclo celular. Estas células em senescência replicativa são resistentes à apoptose induzida por diversos estímulos indutores de apoptose, como anticorpos contra Fas, privação de IL-2, galectina-1 e estaurosporina. Esse efeito parece ser induzido por aumento da expressão de proteínas anti-apoptóticas, como bcl2, e redução dos níveis de caspase-3 (56). O encurtamento telomérico é uma característica marcante destas células, medindo aproximadamente 5-7 Kilobases (57). De uma forma interessante, o marcante encurtamento telomérico é específico para o subtipo CD8 não afetando o subtipo CD4 (Fig. 4). Isso se deve a expressão transiente da enzima telomerase no subtipo CD8, enquanto sua expressão é mantida na população CD4, desta forma células CD4+CD28- são muito

menos frequentes (57). O mecanismo pelo qual ocorre a expressão diferencial da enzima telomerase nos dois subtipos linfocitários ainda é pouco conhecido.

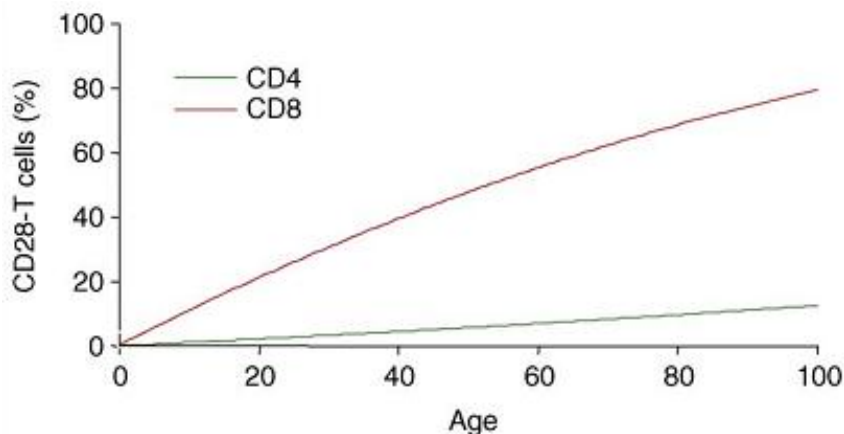


Fig 4. Aumento da proporção de células CD28- com a idade. Retirado de Weng, N.P. 2009

O processo de senescência celular e perda da expressão de CD28 exerce profundas alterações na funcionalidade dos linfócitos CD8. O aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 e TNF- α e a diminuição na produção de IFN- γ , são características das células CD8+CD28- (58). O IFN- γ é uma citocina relacionada com o combate a infecções virais e a diminuição de sua produção, pode alterar significativamente a capacidade do indivíduo em responder a infecções virais. Outra característica é a redução na expressão de perforinas, diminuindo a capacidade destas células em eliminar células alvo (59).

Acredita-se que a expansão da população de células CD8+CD28- pode prejudicar a função imunológica por influenciar a composição e qualidade do *pool* de células T. Uma vez geradas, células senescentes CD8+ se acumulam por serem resistentes à apoptose, resultando na redução da proporção de células capazes de proliferar. Além disso, acredita-se que as células CD8+CD28- surjam de processos de expansão clonal.

Dessa forma, o aumento das células senescentes tende restringir o repertório antigênico ao qual o indivíduo é capaz de responder, levando a menor capacidade de enfrentar diferentes infecções (58, 60, 61).

De uma forma interessante, o aumento na proporção de células CD8+CD28⁻ circulantes vem sendo demonstrado um preditor de incompetência imunológica em idosos (62). Altas frequências de células CD28⁻ em idosos correlacionaram com uma baixa resposta a vacinação contra influenza (54). Além disso, estudos prospectivos demonstraram uma maior taxa de mortalidade em idosos que apresentam maiores níveis de células CD8+CD28⁻ (63, 64).

1.2.2.2. Citomegalovírus

O citomegalovírus (CMV) é um vírus ubíquo, pertencente à família dos β -herpes vírus. Sua prevalência cresce com a idade, variando de 40% (18-24 anos) a mais de 90% (75-80 anos)(65). Normalmente a infecção aguda por CMV é assintomática, mesmo em recém-nascidos. No entanto, uma vez estabelecida, a infecção se torna persistente e uma prioridade para o sistema imunológico uma vez que o vírus não é completamente eliminado (66). O vírus pode sofrer reativações durante períodos de imunodepressão, como esplenectomia e situações estressantes, normalmente sem sinais clínicos (67). Em casos de imunossuprimidos a infecção por CMV pode apresentar sintomas graves, como mononucleose e hepatite (68, 69).

A infecção por CMV, e intrigantemente não outros herpes vírus, vem sendo descrita como uma das principais causas de expansão clonal de células CD8, levando ao acúmulo de células CD8+CD28⁻ (60, 70), restrição

do repertório antigênico e uma maior mortalidade em idosos (66). Tais achados científicos são tão pronunciado a ponto de pensar-se na erradicação do CMV como uma estratégia para diminuir custos à saúde pública (66).

As causas para esse efeito específico para o CMV ainda não são completamente entendidas, mas especula-se que isso seja devido ao fato de as células que atuam como reservatórios do vírus (células dendríticas e endoteliais) estarem em íntima ligação com o sistema imunológico (71-73).

2. Artigo Científico

Submetido à revista: Bipolar Disorders (IF: 5,28)

HUMAN CYTOMEGALOVIRUS IS ASSOCIATED WITH SHORTENED TELOMERES IN TYPE 1 BIPOLAR DISORDER

Lucas Bortolotto Rizzo ^{1#}, Carine Hartmann Do Prado ^{1#}, Rodrigo Grassi-Oliveira ^{1,2}, Andréa Wieck ¹, Bruna Luz Correa ¹, Antonio L. Teixeira ³, and Moisés Evandro Bauer ^{1,2}

¹ Laboratory of Immunosenescence, Institute of Biomedical Research, Pontifical Catholic University of the Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, Brazil;

² Research center of traumatic stress (NEPTE), Faculty of Psychology, PUCRS, Porto Alegre, Brazil.

³ Translational Psychoneuroimmunology Group, UFMG, Belo Horizonte, Brazil;

Total words in text: 2464

Total words in abstract: 173

Number of figures: 1

Number of tables: 1

Number of supplementary material: 0

Corresponding author: Dr. Moisés E. Bauer, Faculty of Biosciences, Instituto de Pesquisas Biomédicas, Hospital São Lucas da PUCRS, Av. Ipiranga 6690, 2^o andar, P.O. Box 1429, Porto Alegre, RS 90.610-000, Brazil. E-mail: mebauer@pucrs.br

Lucas Bortolotto Rizzo and Carine Hartmann do Prado contributed equally to this work.

2.1. Abstract

Background: Bipolar disorder (BD) has been associated with increased low-grade inflammation and premature cell senescence, as shown by reduced telomere length (TL). The human cytomegalovirus (CMV) promotes a latent asymptomatic infection in immunocompetent adults, and it has increasingly been involved with accelerated immunosenescence in aging studies. Here, we investigated the CMV serology and its relationships with cell senescence markers including TL and lymphocyte subsets in type 1 BD and healthy controls. **Methods:** Peripheral blood mononuclear cells and DNA were isolated and TL measured in twenty-two euthymic female BD type 1 patients and 17 age-matched controls by RT-qPCR. CMV-IgM and IgG titers were assessed by chemiluminescent assays. Lymphocyte subsets (T, NK, NKT) were phenotyped by flow cytometry. **Results:** BD patients had shorter TL but increased CMV-IgG levels than controls (all $p < 0.01$). The CMV-IgG levels were inversely correlated with shorter the telomeres. None of the subjects showed IgM reactivity for CMV, excluding acute viral infection. CMV-IgG levels were associated with expansion of senescent CD8+CD28- T cells and NK cells, involved with viral control.

Conclusions: These data concur to the hypothesis early accelerated aging in BD as shown by shortened telomeres and expansion of senescent T cells. This study also indicates that CMV infection may be a driving force in the process of early immunosenescence in BD.

Keywords: Telomeres, Bipolar Disorder, Cytomegalovirus, Immunosenescence, Lymphocytes.

2.2. Introduction

Bipolar disorder (BD) has been associated with immunologic imbalance, as shown by increased peripheral inflammatory markers (1-4), and accelerated cell aging (5, 6). Shortened telomeres are good correlates of replicative senescence, oxidative stress and aging and have previously been documented in mood disorders (7) and BD type II (5, 8), supporting the hypothesis of increased allostatic load in this disorder (9).

The accelerated cell senescence in BD can also be demonstrated by changes in specific lymphocyte subsets. We have recently reported increased number of late-differentiated CD8⁺ T cells that lack CD28 expression (CD8⁺CD28⁻) in euthymic type 1 BD patients (10). These cells are expanded during aging, resistant to apoptosis, proliferate poorly, and are often referred as senescent memory T cells (11, 12). The expansion of CD8⁺CD28⁻ T cells has been related to poor immune responses and increased mortality risk in the elderly (13). These cells have undergone many rounds of cell divisions presumably as a result of lifetime exposure to common persistent antigens. Indeed, CD8⁺CD28⁻ T senescent cells characteristically accumulate during persistent viral infections, including HIV, HTLV-1 and human cytomegalovirus (CMV) (14-16).

The CMV is a ubiquitous β -herpes virus infection with increased age-related prevalence, ranging from 40% (18-24 years old) to > 90% (75-80 years old) (17). Under most circumstances the CMV promotes a latent asymptomatic infection, but it has increasingly been involved with accelerated human immunosenescence. For instance, cross-sectional and

prospective aging studies reported that CMV is associated with expansion of late-differentiated CD8+ T cells, reduced T-cell repertoire, reduced B cell numbers, increased plasma IL-6 levels, increased morbidity and mortality in very old subjects (18). However, the concept of accelerated cell aging in BD has been under-investigated. Here, we investigated the CMV serology and its relationships with cellular senescence markers including telomere lengths (TL) and lymphocyte subsets in euthymic patients with type 1 BD and healthy controls.

2.3. Methods

2.3.1. Subjects

Twenty-two euthymic female subjects with BD type 1 were recruited by convenience sampling from outpatient treatment program (Porto Alegre, Brazil). Only women took part in this study to avoid immunological differences associated with sexual dimorphism (19). Age- and sex-matched healthy controls also took part in this study. All subjects provided their written informed consent before inclusion in the study approved by the Ethical Committee of the institution. The BD type 1 diagnosis was based on clinical interview and confirmed with the Structured Clinical Interview for DSM-IV-Axis I Disorder (SCID-I) administered by an expert and well-trained psychiatrist. All patients were euthymic at the time of blood collection. Euthymia was defined by YMRS and HDRS scores < 8 (20). Exclusion criteria to both patients and controls included: a) Presence of major axis I psychiatric disorder such as psychotic disorder, mood disorder (for control group), anxiety disorder or substance related disorder according to SCID-I; b)

history of brain injury; c) presence of systemic diseases (including hypertension, inflammatory diseases, such as rheumatoid arthritis or infection) or neurological disorder, and d) use of any substance that may induce immune or endocrine changes (exception of psychopharmacotherapy for BD patients).

2.3.2. Blood collection and cell isolation

Twenty milliliters of peripheral blood were collected by venipuncture between 10:00 AM - 12:00 PM and stored in EDTA tubes prior to analyses. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated by density gradient centrifugation for 30 min at 900 g. Cells were counted by means of microscopy (100x) and viability always exceeded 95%, as judged from their ability to exclude Trypan Blue (Sigma). PBMCs were resuspended in complete culture medium (RPMI-1640, supplemented with 0.5% gentamicine, 1% glutamine, 1% hepes, 0.1% fungizone, and 10% fetal calf serum, FCS; all from Sigma) and we proceeded with immunophenotyping. An aliquot was frozen in -80°C for posterior telomere length measurement.

2.3.3. Immunophenotyping

Briefly, fresh PBMCs were washed in flow cytometry buffer (PBS containing 1% FCS and 0.01% sodium azide) and treated with Fc Block solution for 20 min. In order to evaluate specific lymphocyte subsets, cells were stained for 30 min with combinations of the following monoclonal antibodies: anti-CD3 PE-Cy5, anti-CD8 PE, anti-CD56 FITC, anti-CD28 FITC (all from BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Immediately after staining, cells were washed, resuspended and analyzed by flow cytometry. A

minimum of 20,000 lymphocytes were identified by size (FSC) and granularity (SSC) and acquired with a FACS Canto II flow cytometer (BD Biosciences). The instrument has been checked for sensitivity and overall performance with Cytometer Setup & Tracking beads (BD Biosciences) prior to data acquisition. Data were analyzed using the Flowjo 7.2.5 software (Tree Star Inc., Ashland, Or, USA).

2.3.4. CMV serology

Aliquots of peripheral blood were collected without anticoagulant in order to assess serum CMV-IgM (active disease or recent infection) or CMV-IgG by chemiluminescent enzyme immunometric assays (Immulite™ immunoassay system, Siemens, São Paulo, Brazil). The sensitivity and specificity of these assays was estimated in >95%. Samples were considered positive (reactive) for CMV when the values were above the cut off values: CMV-IgG or CMV-IgM (> 1.0 UI/mL). The intra- and inter-assay coefficients of variation were less than 5%. The results are expressed in units international per milliliter (UI/mL).

2.3.5. Telomere length (TL) assessment

Genomic DNA was isolated from thawed PBMCs using PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) following manufacturer instructions. Quantification from DNA samples were made using Qubit (Invitrogen). TL was measured as previously described by Cawthon with some modifications (21, 22). The TL measurement by the quantitative PCR assay consists of determining the relative ratio of telomere (T) repeat copy number to a single copy gene (S) copy number (T/S ratio) in

experimental samples using a standard curve. This ratio is proportional to the average TL. Then the ratio for each sample was normalized to a reference sample present in all experiments.

Telomere and β -Globin (single copy gene) PCRs were done on separate plates. Two master mixes of PCR reagents were prepared, one with telomere primer pairs (tel-1, 5'-GGTTTTTGAGGGTGAGGGTGAGGGTGAGGGT-3'; tel-2, 5'-CCCGACTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTA-3') and the other with β -Globin primer pairs (HBG1, 5'-GCTTCTGACACAACACTGTGTTCACTAGC-3'; HBG2, 5'-CACCAACTTCATCCACGTTCCACC-3'). The final telomere primer concentrations were 250nM for both primers. And the final β -globin primer concentrations were 400nM for both primers. The mix was also composed of Power SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA). A 2,5ng (1 μ L) aliquot of Template DNA was present in each reaction well. The final volume of the reaction well was 10 μ L for β -globin and 25 μ L for Telomere.

The standard curve was composed of a 5 points serial dilution of a reference DNA. The DNA was from a single person and the dilution ranged from 10ng to 0.62ng. The PCRs were all done on a 48-well StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems). The thermal cycling profile for telomere amplification consisted of a preparation step of 10 min at 95°C, followed by 40 cycles at 95°C for 15 sec, 56°C for 30sec, and 72°C for 30sec. The β -globin amplification profile was 95°C for 10 min followed by 40

cycles of 95°C for 15 sec and 58°C for 1 min. After amplification, a melt curve was done to confirm the specificity of the reaction.

2.3.6. Statistical analysis

All variables were tested for homogeneity of variances and normality of distribution by means of the Levene and Kolmogorov-Smirnov tests, respectively. Statistical interactions between categorical variables and group were compared by means of the chi-square (χ^2) test. For continuous variables, differences between groups were analyzed by Student t-test or Mann-Whitney U test when appropriate. Analysis of co-variance (ANCOVA) was performed entering BMI as covariate. As BD patients had higher BMI than healthy controls ($p=0.001$), this parameter was entered as covariate in subsequent analyses. The correlations were explored using Pearson's test. Statistical analyses were performed using the Statistical Package for Social Sciences, SPSS Statistics 17.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). The significance level was set at $\alpha < 0.05$ (two-tailed).

2.4. Results

2.4.1. Clinical parameters and CMV serology

Demographic and clinical characteristics of the samples are summarized in Table 1. None of the subjects showed IgM reactivity for CMV, excluding acute viral infection. Although the prevalence of CMV serology was the same between both groups (Control = 88.2% and BD = 90.9%, $p = 0.18$), BD patients had significantly higher CMV-IgG titers than healthy controls, $p < 0.01$ (Fig. 1B), controlling for age and BMI.

2.4.2. Telomere length (TL)

Peripheral blood mononuclear cells of BD patients had significantly shorter telomeres compared to age-matched controls (Fig. 1A), $p < 0.01$, controlling for age and BMI. TL was not associated with clinical parameters (years of illness, HDRS, YMRS). Remarkably, the CMV serology was found associated with TL: the higher the anti-CMV IgG levels, the shorter the telomeres ($r = 0.42$, $p = 0.01$), Fig. 1C.

2.4.3. Relationships between CMV serology and lymphocytes

We have recently observed significantly expansions of CD8+CD28- T senescent cells in euthymic type 1 BD patients (10). Here, we found positive associations between anti-CMV IgG and percentage of CD8+CD28- T cells ($r = 0.35$, $p < 0.05$) (not shown). We have also sought to investigate the relationships between CMV serology and lymphocytes involved in controlling viral infections (NK, NKT and CD8+CD28+ T cells). The CMV IgG levels were found positively correlated with the percentage of NK cells ($r = 0.43$, $p < 0.05$) (not shown). With respect to possible effects of pharmacotherapy, no significant associations were found with the immunological measures (all $p > 0.05$, assessed by Mann-Whitney Tests).

2.5. Discussion

The accelerated cell aging was observed in euthymic type 1 BD patients, as shown by shortened telomeres and expansion of CD8+CD28- T cells which correlated with increased IgG anti-CMV serology. Our data support previous studies reporting shortened telomeres in type 2 BD (8), major depression (5, 7, 23, 24) or chronic psychosocial stress (25).

Wolkowitz and colleagues reported an inverse correlation between duration of MDD and TL (7). Recently, the mean TL was associated with lifetime number of depressive episodes, but not with illness duration (8). The clinical parameters were not associated with shortened TL in the present study. Taken into account that only euthymic patients were included in this study, one may speculate that accelerated cell aging in type 1 BD could be a trait and not a state phenomenon. Longitudinal studies are necessary to better explore the relationships between TL and clinical parameters in BD.

Accelerated telomere shortening may reflect stress-related oxidative damage to cells and accelerated aging. Indeed, chronic psychosocial stress has been reported as an important factor for telomere shortening in healthy individuals (25) as well as in mood disorders (5, 6). The cycling characteristic of the BD has been considered as a chronic stressor in BD (9). There is evidence suggesting an imbalance between pro-oxidant/anti-oxidant states in BD, leading to increased oxidative stress and telomere erosion (26). It has been shown that BD patients have increased serum TBARS – a measure of lipid peroxidation – across all mood states (26). Post mortem studies also reported downregulation of genes involved with mitochondrial function in the hippocampus and prefrontal cortex of BD patients (27, 28).

Accelerated cell aging can be also demonstrated by the expansion of senescent CD8+CD28- T cells (10), associated here with increased IgG serology to CMV. Increased IgG serology to CMV has been observed during human aging and associated with accelerated immunosenescence (18). Interestingly, CMV has a pivotal role in driving CD8+CD28- T cell expansion

during aging (29). We hypothesize that CMV may also have an important role in accelerating cell aging in BD. The proportion of CD8+CD28- senescent T cells increases with age (30, 31), and was associated with a poor immune response after immunization (32, 33) and higher mortality risk (13). CD28 is the main co-stimulatory receptor in T cells (34). Its expression on lymphocyte membrane is fundamental for complete cell activation and proliferation after T-cell stimulation, since that the loss of CD28 expression has a profound impact on T cell function (35). It is believed that CD8+ cells down-regulate CD28 expression after several rounds of proliferation since CD8+CD28- T cells are resistant to apoptosis, have short telomeres, and proliferate poorly (11, 12). CMV infection is known to reactivate during immunosuppression periods, and mood disorders and BD have been characterized with suppressed immune functions (36). The increased allostatic load in BD may thus lead to higher CMV reactivation, expansion of senescent CD8+CD28- T cells and telomere shortening.

We have also investigated the relationships between CMV serology and lymphocytes involved in controlling viral infections (NK, NKT and CD8+CD28+ T cells). Of special note, NK cells play an important role in the recognition and regulation of virally infected cells and are particularly involved in immunosurveillance against CMV (37). Here, the CMV IgG serology was found positively correlated with the percentage of NK cells. These data indicate that chronic CMV reactivations, as suggested by increased IgG but not IgM levels, would elicit higher immunosurveillance by NK cells in order to keep this ubiquitous viral infection under control.

There is no evidence linking CMV infection with the etiology of BD. No study reported increased risk for CMV infection in BD patients nor correlated CMV serology with clinical severity. Two previous studies reported higher CMV IgG serology in bipolar patients as compared to healthy controls (38, 39), but no correlations with clinical or immune parameters were explored. The idea that microbial agents may cause psychiatric diseases has a long history. For instance, the protozoan *Toxoplasma gondii* and CMV have been linked to the development of schizophrenia, although with modest odds ratios (40). The most important CMV clinical presentations are congenital and systemic infections in immunosuppressed subjects. Congenital infections may produce mental retardation, visual impairment, hearing loss and other deficits in the newborn. The CMV reactivations in immunosuppressed individuals, as occurs in HIV and transplantation, lead to various clinical consequences including encephalitis, pneumonia, hepatitis, retinitis and hepatitis (41). Interestingly, the CMV induces the production of prostaglandin E2 in human fibroblasts and the COX-2 inhibitor strongly blocks the viral replication in these cells (42). In addition, a major CMV envelope glycoprotein (gB) upregulates the expression of NFκB (43), a key transcription factor to pro-inflammatory genes. Therefore, the pro-inflammatory state (immunological imbalance) repeatedly reported in BD could be directly involved with CMV reactivations.

This study has some limitations. Because of its cross-sectional design, we cannot rule out that type 1 BD patients were born with shorter telomeres than healthy controls or that BD patients with shortened BD are more prone

to psychopathology. Although pharmacotherapy was not associated with TL and immune variables, the use of psychotropic drugs may be another confounding factor. However, mood stabilizers and antidepressants have been shown to protect against oxidative stress in rodents (44, 45) and theoretically to telomere erosion. In addition, the modest sample sizes may reduce the generalizability of our findings.

Our data concur to the hypothesis of a process of accelerated aging in mood disorders (6), as shown here by shortened telomeres and expansion of senescent T cells. This study also indicates that CMV infection may be a driving force in the process of early immunosenescence in BD. Future studies should explore the clinical significance of these findings in a prospective setting.

2.6. Acknowledgments

We are very grateful to the patients and staff at the Hospital Presidente Vargas. We would like also to thank Ledo Daruy Filho, MD for helping with psychiatric assessments. This work was supported by grants from CNPq (MEB, LBR, ALT and RG-O) and CAPES (CHP, AW).

2.7. Financial disclosures

The authors have no conflict of interests to declare.

2.8. References

1. Brietzke E, Stertz L, Fernandes BS, Kauer-Sant'anna M, Mascarenhas M, Escosteguy Vargas A, et al. Comparison of cytokine levels in depressed, manic and euthymic patients with bipolar disorder. *J Affect Disord.* 2009; 116:214-7.

2. Barbosa IG, Rocha NP, Huguet RB, Ferreira RA, Salgado JV, Carvalho LA, et al. Executive dysfunction in euthymic bipolar disorder patients and its association with plasma biomarkers. *J Affect Disord.* 2012; 137:151-5.
3. Drexhage RC, Hoogenboezem TH, Versnel MA, Berghout A, Nolen WA, Drexhage HA. The activation of monocyte and T cell networks in patients with bipolar disorder. *Brain Behav Immun.* 2011; 25:1206-13.
4. Breunis MN, Kupka RW, Nolen WA, Suppes T, Denicoff KD, Leverich GS, et al. High numbers of circulating activated T cells and raised levels of serum IL-2 receptor in bipolar disorder. *Biol Psychiatry.* 2003; 53:157-65.
5. Simon NM, Smoller JW, McNamara KL, Maser RS, Zalta AK, Pollack MH, et al. Telomere shortening and mood disorders: preliminary support for a chronic stress model of accelerated aging. *Biol Psychiatry.* 2006; 60:432-5.
6. Wolkowitz OM, Epel ES, Reus VI, Mellon SH. Depression gets old fast: do stress and depression accelerate cell aging? *Depress Anxiety.* 2010; 27:327-38.
7. Wolkowitz OM, Mellon SH, Epel ES, Lin J, Dhabhar FS, Su Y, et al. Leukocyte telomere length in major depression: correlations with chronicity, inflammation and oxidative stress--preliminary findings. *PLoS One.* 2011; 6:e17837.
8. Elvsashagen T, Vera E, Boen E, Bratlie J, Andreassen OA, Josefsen D, et al. The load of short telomeres is increased and associated with lifetime number of depressive episodes in bipolar II disorder. *J Affect Disord.* 2011; 135:43-50.
9. Kapczinski F, Vieta E, Andreazza AC, Frey BN, Gomes FA, Tramontina J, et al. Allostatic load in bipolar disorder: implications for pathophysiology and treatment. *Neurosci Biobehav Rev.* 2008; 32:675-92.
10. Prado CH, Rizzo LB, Wieck A, Lopes RP, Teixeira AL, Grassi-Oliveira R, et al. Reduced regulatory T cells are associated with higher levels of Th1/Th17 cytokines and activated MAPK in type 1 bipolar disorder. *Psychoneuroendocrinology.* 2012.
11. Effros RB, Dagarag M, Spaulding C, Man J. The role of CD8+ T-cell replicative senescence in human aging. *Immunol Rev.* 2005; 205:147-57.
12. Vallejo AN. CD28 extinction in human T cells: altered functions and the program of T-cell senescence. *Immunol Rev.* 2005; 205:158-69.

13. Wang GC, Kao WH, Murakami P, Xue QL, Chiou RB, Detrick B, et al. Cytomegalovirus infection and the risk of mortality and frailty in older women: a prospective observational cohort study. *Am J Epidemiol.* 2010; 171:1144-52.
14. Effros RB, Allsopp R, Chiu CP, Hausner MA, Hirji K, Wang L, et al. Shortened telomeres in the expanded CD28-CD8+ cell subset in HIV disease implicate replicative senescence in HIV pathogenesis. *AIDS.* 1996; 10:F17-22.
15. Ouyang Q, Wagner WM, Wikby A, Walter S, Aubert G, Dodi AI, et al. Large numbers of dysfunctional CD8+ T lymphocytes bearing receptors for a single dominant CMV epitope in the very old. *J Clin Immunol.* 2003; 23:247-57.
16. Pillat MM, Correa BL, da Rocha CF, Muller GC, Lopes RP, Lampert SS, et al. Changes in T cell phenotype and activated MAPKs are correlated to impaired cellular responses to antigens and glucocorticoids during HTLV-I infection. *J Neuroimmunol.* 2009; 216:76-84.
17. Badami KG, McQuilkan-Bickerstaffe S, Wells JE, Parata M. Cytomegalovirus seroprevalence and 'cytomegalovirus-safe' seropositive blood donors. *Epidemiol Infect.* 2009; 137:1776-80.
18. Pawelec G, Derhovanessian E. Role of CMV in immune senescence. *Virus Res.* 2011; 157:175-9.
19. Ghazeeri G, Abdullah L, Abbas O. Immunological differences in women compared with men: overview and contributing factors. *Am J Reprod Immunol.* 2011; 66:163-9.
20. Clark L, Iversen SD, Goodwin GM. Sustained attention deficit in bipolar disorder. *Br J Psychiatry.* 2002; 180:313-9.
21. Cawthon RM. Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Res.* 2002; 30:e47.
22. Das B, Saini D, Seshadri M. Telomere length in human adults and high level natural background radiation. *PLoS One.* 2009; 4:e8440.
23. Hartmann N, Boehner M, Groenen F, Kalb R. Telomere length of patients with major depression is shortened but independent from therapy and severity of the disease. *Depress Anxiety.* 2010; 27:1111-6.
24. Wikgren M, Maripuu M, Karlsson T, Nordfjall K, Bergdahl J, Hultdin J, et al. Short telomeres in depression and the general population are associated with a hypocortisolemic state. *Biol Psychiatry.* 2012; 71:294-300.

25. Epel ES, Blackburn EH, Lin J, Dhabhar FS, Adler NE, Morrow JD, et al. Accelerated telomere shortening in response to life stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101:17312-5.
26. Andreazza AC, Cassini C, Rosa AR, Leite MC, de Almeida LM, Nardin P, et al. Serum S100B and antioxidant enzymes in bipolar patients. *J Psychiatr Res*. 2007; 41:523-9.
27. Iwamoto K, Bundo M, Kato T. Altered expression of mitochondria-related genes in postmortem brains of patients with bipolar disorder or schizophrenia, as revealed by large-scale DNA microarray analysis. *Hum Mol Genet*. 2005; 14:241-53.
28. Sun X, Wang JF, Tseng M, Young LT. Downregulation in components of the mitochondrial electron transport chain in the postmortem frontal cortex of subjects with bipolar disorder. *J Psychiatry Neurosci*. 2006; 31:189-96.
29. Almanzar G, Schwaiger S, Jenewein B, Keller M, Herndler-Brandstetter D, Wurznner R, et al. Long-term cytomegalovirus infection leads to significant changes in the composition of the CD8+ T-cell repertoire, which may be the basis for an imbalance in the cytokine production profile in elderly persons. *J Virol*. 2005; 79:3675-83.
30. Boucher N, Dufeu-Duchesne T, Vicaut E, Farge D, Effros RB, Schachter F. CD28 expression in T cell aging and human longevity. *Exp Gerontol*. 1998; 33:267-82.
31. Faria AM, de Moraes SM, de Freitas LH, Speziali E, Soares TF, Figueiredo-Neves SP, et al. Variation rhythms of lymphocyte subsets during healthy aging. *Neuroimmunomodulation*. 2008; 15:365-79.
32. Saurwein-Teissl M, Lung TL, Marx F, Gschosser C, Asch E, Blasko I, et al. Lack of antibody production following immunization in old age: association with CD8(+)/CD28(-) T cell clonal expansions and an imbalance in the production of Th1 and Th2 cytokines. *J Immunol*. 2002; 168:5893-9.
33. Goronzy JJ, Fulbright JW, Crowson CS, Poland GA, O'Fallon WM, Weyand CM. Value of immunological markers in predicting responsiveness to influenza vaccination in elderly individuals. *J Virol*. 2001; 75:12182-7.
34. Acuto O, Michel F. CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling. *Nat Rev Immunol*. 2003; 3:939-51.
35. Effros RB, Cai Z, Linton PJ. CD8 T cells and aging. *Crit Rev Immunol*. 2003; 23:45-64.

36. Blume J, Douglas SD, Evans DL. Immune suppression and immune activation in depression. *Brain Behav Immun*. 2011; 25:221-9.
37. Lopez-Botet M, Angulo A, Guma M. Natural killer cell receptors for major histocompatibility complex class I and related molecules in cytomegalovirus infection. *Tissue Antigens*. 2004; 63:195-203.
38. Leweke FM, Gerth CW, Koethe D, Klosterkötter J, Ruslanova I, Krivogorsky B, et al. Antibodies to infectious agents in individuals with recent onset schizophrenia. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 2004; 254:4-8.
39. Tedla Y, Shibre T, Ali O, Tadele G, Woldeamanuel Y, Asrat D, et al. Serum antibodies to *Toxoplasma gondii* and Herpesviridae family viruses in individuals with schizophrenia and bipolar disorder: a case-control study. *Ethiop Med J*. 2011; 49:211-20.
40. Yolken RH, Torrey EF. Are some cases of psychosis caused by microbial agents? A review of the evidence. *Mol Psychiatry*. 2008; 13:470-9.
41. Taylor GH. Cytomegalovirus. *Am Fam Physician*. 2003; 67:519-24.
42. Zhu H, Cong JP, Yu D, Bresnahan WA, Shenk TE. Inhibition of cyclooxygenase 2 blocks human cytomegalovirus replication. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99:3932-7.
43. Yurochko AD, Hwang ES, Rasmussen L, Keay S, Pereira L, Huang ES. The human cytomegalovirus UL55 (gB) and UL75 (gH) glycoprotein ligands initiate the rapid activation of Sp1 and NF-kappaB during infection. *J Virol*. 1997; 71:5051-9.
44. Eren I, Naziroglu M, Demirdas A. Protective effects of lamotrigine, aripiprazole and escitalopram on depression-induced oxidative stress in rat brain. *Neurochemical research*. 2007; 32:1188-95.
45. Shao L, Young LT, Wang JF. Chronic treatment with mood stabilizers lithium and valproate prevents excitotoxicity by inhibiting oxidative stress in rat cerebral cortical cells. *Biol Psychiatry*. 2005; 58:879-84.

FIGURE LEGEND

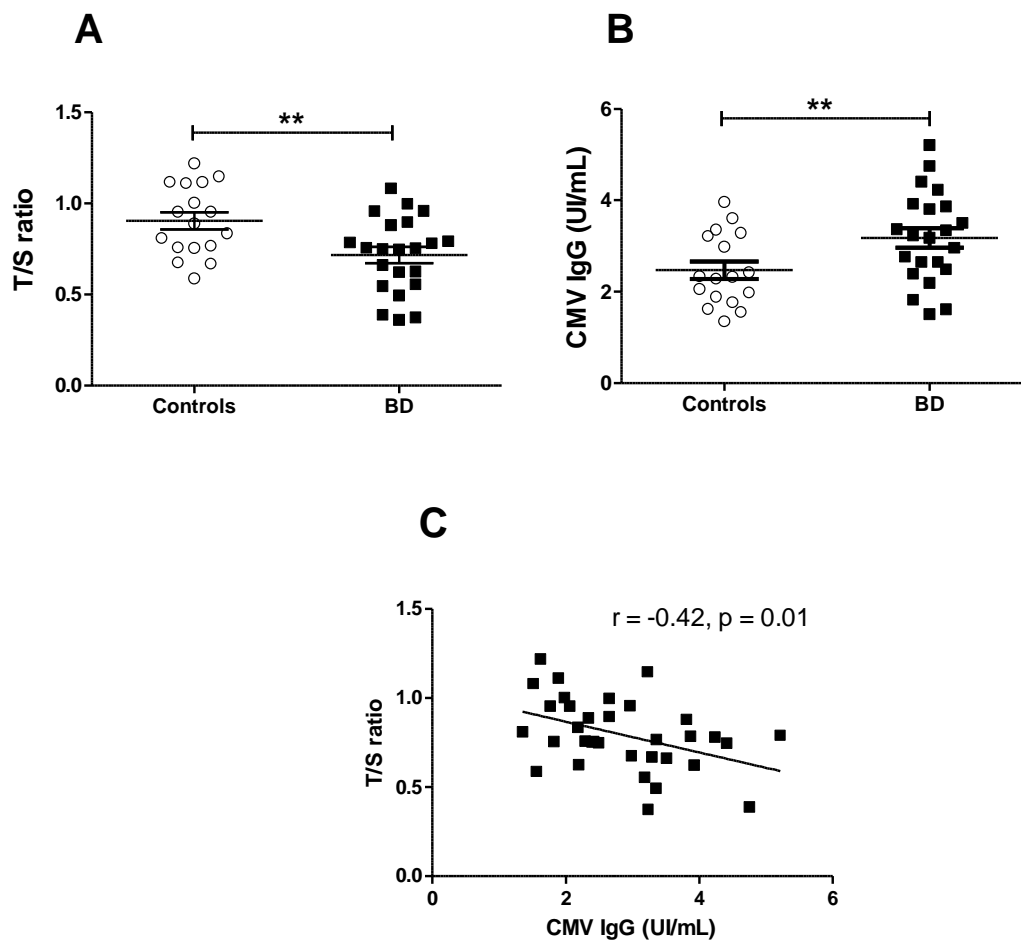
Figure 1. Reduced telomere length (T/S) and higher serology to CMV in BD. Figure A shows the telomere shortening in the BD group as compared to controls. Figure B shows the elevated serum titers of anti-CMV IgG in BD patients. T/S ratio = relative ratio of telomere (T) repeat copy number to a single copy gene (S) copy number. ** $p < 0.01$, Student t-test.

Table 1. Characteristics of the studied populations.

	Healthy Controls	BD	P-value
N	17	22	-
Age (M \pm SD)	39.47 \pm 12.89	44.62 \pm 9.30	0.15
BMI (M \pm SD)	23.61 \pm 1.60	28.99 \pm 5.55	0.001
Years of illness (M and interval)	-	9.45 (1-25)	-
HDRS (M \pm SD)	-	5.27 \pm 2.35	-
YMRS (M \pm SD)	-	2.18 \pm 2.44	-
Lithium	-	15	-
Antidepressants	-	10	-
Antipsychotics	-	7	-
Anticonvulsants	-	4	-

Data shown as mean (M) \pm standard deviation (SD). Abbreviations: BMI, body mass index, Bipolar disorder (BD), Cytomegalovirus (CMV), Hamilton Depression Rating Scale (HDRS) and Young Mania Rating Scale (YMRS). Data were analyzed by Student t test.

Figure 1



3. Conclusões e perspectivas

O Transtorno Bipolar é uma doença crônica, progressiva, altamente debilitante e que apresenta uma alta prevalência na população mundial, no entanto a etiologia e patofisiologia deste transtorno ainda são pouco conhecidos. Diversos estudos vêm demonstrando alterações imunológicas no TB, como, por exemplo, um aumento nos níveis de citocinas pró-inflamatórias e uma maior proporção de linfócitos ativados no sangue periférico. A hipótese envelhecimento acelerado no TB e outros transtornos de humor é uma ideia crescente neste ramo científico, e se baseia fundamentalmente no encurtamento telomérico encontrado em células sanguíneas destes pacientes.

Em um estudo recentemente publicado por nosso grupo de pesquisas relatamos algumas alterações imunológicas em pacientes com TB (26). Mostramos que, na presença do mitógeno fitohemaglutinina, PBMCs de pacientes com TB tendem a produzir uma resposta do tipo Th1. Estes pacientes também apresentaram uma diminuição no percentual de células T regulatórias (CD4+CD25+FoxP3+) circulantes e aumento na proporção de células senescentes (CD8+CD28-). Além disso, linfócitos de pacientes com TB apresentaram uma maior fosforilação de ERK1/2 (*extracellular-signal-regulated kinases*), uma proteínas relacionada a processos de ativação, sobrevivência e proliferação celular. Intrigantemente, estes processos parecem convergir e possivelmente serem responsáveis pelo processo de imunossenescência destes pacientes (aumento de células CD8+CD28- e encurtamento dos telômeros) (Fig. 5).

No presente trabalho, relatamos que pacientes com TB apresentam maiores taxas de infecção por CMV. Além disso, quanto maiores foram as taxas de infecção, maiores as proporções de células CD8+CD28- e menor o comprimento telomérico. Estes dados demonstram que a infecção latente, assintomática e aparentemente inofensiva característica do CMV pode estar modulando o processo de desbalanço imunológico presente no TB (Fig. 5).

O modelo transversal adotado neste trabalho torna incapaz de demonstrar se esta infecção é a responsável inicial pela desregulação imune que ocorre no TB e o porquê desses pacientes apresentarem uma maior taxa de infecção por CMV. Assim, mais estudos são necessários para esclarecer o papel da infecção por CMV nas alterações imunológicas apresentadas no TB.

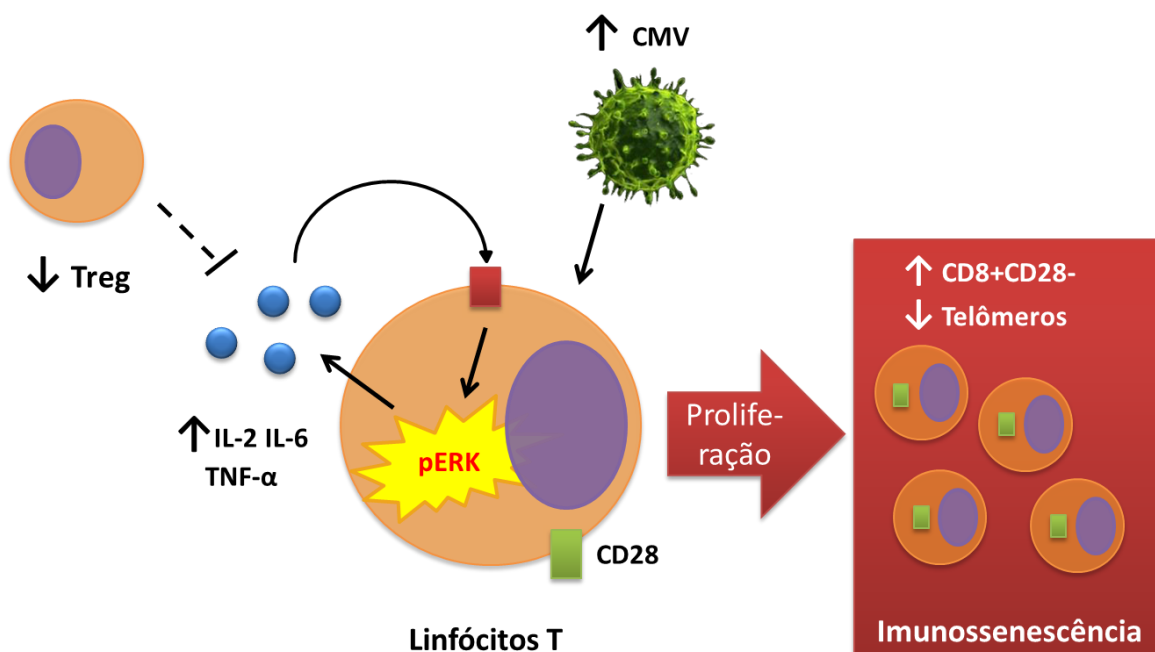


Fig 5. Alterações imunológicas presentes no TB e sua possível relação na indução de imunossenescência precoce nestes pacientes.

4. Referências

1. Gonzalez-Pinto A, Gutierrez M, Mosquera F, Ballesteros J, Lopez P, Ezcurra J, et al. First episode in bipolar disorder: misdiagnosis and psychotic symptoms. *J Affect Disord.* 1998; 50:41-4.
2. World Health Organization. The ICD-10 classification of mental and behavioural disorders: clinical descriptions and diagnostic guidelines. Geneva : WHO, 2010.
3. American Psychiatric Association. (2000). Diagnostic and statistical manual of mental disorders (4th ed., text rev.). Washington, DC.
4. Provencher MD, Hawke LD, Thienot E. Psychotherapies for comorbid anxiety in bipolar spectrum disorders. *J Affect Disord.* 2011; 133:371-80.
5. Benazzi F. Bipolar II disorder : epidemiology, diagnosis and management. *CNS Drugs.* 2007; 21:727-40.
6. Merikangas KR, Jin R, He JP, Kessler RC, Lee S, Sampson NA, et al. Prevalence and correlates of bipolar spectrum disorder in the world mental health survey initiative. *Arch Gen Psychiatry.* 2011; 68:241-51.
7. Bauer M, Pfennig A. Epidemiology of bipolar disorders. *Epilepsia.* 2005; 46 Suppl 4:8-13.
8. Kessler RC, Merikangas KR, Wang PS. Prevalence, comorbidity, and service utilization for mood disorders in the United States at the beginning of the twenty-first century. *Annu Rev Clin Psycho.* 2007; 3:137-58.
9. Costello EJ, Pine DS, Hammen C, March JS, Plotsky PM, Weissman MM, et al. Development and natural history of mood disorders. *Biol Psychiatry.* 2002; 52:529-42.
10. American Psychiatric Association. Practice guideline for the treatment of patients with bipolar disorder. *Am J Psychiatry* 1994;151(suppl):1–36.
11. Ketter TA. Diagnostic features, prevalence, and impact of bipolar disorder. *J Clin Psychiatry.* 2010; 71:e14.
12. Grant BF, Stinson FS, Hasin DS, Dawson DA, Chou SP, Ruan WJ, et al. Prevalence, correlates, and comorbidity of bipolar I disorder and axis I and II disorders: results from the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions. *J Clin Psychiatry.* 2005; 66:1205-15.
13. Keller MB. Prevalence and impact of comorbid anxiety and bipolar disorder. *J Clin Psychiatry.* 2006; 67 Suppl 1:5-7.
14. McIntyre RS, Konarski JZ, Yatham LN. Comorbidity in bipolar disorder: a framework for rational treatment selection. *Hum Psychopharmacol.* 2004; 19:369-86.
15. Degenhardt EK, Gatz JL, Jacob J, Tohen M. Predictors of relapse or recurrence in bipolar I disorder. *J Affect Disord.* 2011.
16. McElroy SL, Altshuler LL, Suppes T, Keck PE, Jr., Frye MA, Denicoff KD, et al. Axis I psychiatric comorbidity and its relationship to historical illness variables in 288 patients with bipolar disorder. *Am J Psychiatry.* 2001; 158:420-6.
17. Merikangas KR, Akiskal HS, Angst J, Greenberg PE, Hirschfeld RM, Petukhova M, et al. Lifetime and 12-month prevalence of bipolar spectrum disorder in the National Comorbidity Survey replication. *Arch Gen Psychiatry.* 2007; 64:543-52.

18. Osby U, Brandt L, Correia N, Ekblom A, Soren P. Excess mortality in bipolar and unipolar disorder in Sweden. *Arch Gen Psychiatry*. 2001; 58:844-50.
19. Baldassano CF, Hosey A, Coello J. Bipolar depression: an evidence-based approach. *Curr Psychiatry Rep*. 2011; 13:483-7.
20. Begley CE, Annegers JF, Swann AC, Lewis C, Coan S, Schnapp WB, et al. The lifetime cost of bipolar disorder in the US: an estimate for new cases in 1998. *Pharmacoeconomics*. 2001; 19:483-95.
21. Bunney WE, Jr., Davis JM. Norepinephrine in depressive reactions. A review. *Arch Gen Psychiatry*. 1965; 13:483-94.
22. Schildkraut JJ. The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. *Am J Psychiatry*. 1965; 122:509-22.
23. Brugue E, Vieta E. Atypical antipsychotics in bipolar depression: neurobiological basis and clinical implications. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2007; 31:275-82.
24. Capuron L, Miller AH. Immune system to brain signaling: neuropsychopharmacological implications. *Pharmacol Ther*. 2011; 130:226-38.
25. Miller AH, Maletic V, Raison CL. Inflammation and its discontents: the role of cytokines in the pathophysiology of major depression. *Biol Psychiatry*. 2009; 65:732-41.
26. do Prado CH, Rizzo LB, Wieck A, Lopes RP, Teixeira AL, Grassi-Oliveira R, et al. Reduced regulatory T cells are associated with higher levels of Th1/TH17 cytokines and activated MAPK in type 1 bipolar disorder. *Psychoneuroendocrinology*. 2012.
27. Kupka RW, Breunis MN, Knijff E, Ruwhof C, Nolen WA, Drexhage HA. Immune activation, steroid resistancy and bipolar disorder. *Bipolar Disord*. 2002; 4 Suppl 1:73-4.
28. Ortiz-Dominguez A, Hernandez ME, Berlanga C, Gutierrez-Mora D, Moreno J, Heinze G, et al. Immune variations in bipolar disorder: phasic differences. *Bipolar Disord*. 2007; 9:596-602.
29. Padmos RC, Bekris L, Knijff EM, Tiemeier H, Kupka RW, Cohen D, et al. A high prevalence of organ-specific autoimmunity in patients with bipolar disorder. *Biol Psychiatry*. 2004; 56:476-82.
30. Brietzke E, Stertz L, Fernandes BS, Kauer-Sant'anna M, Mascarenhas M, Escosteguy Vargas A, et al. Comparison of cytokine levels in depressed, manic and euthymic patients with bipolar disorder. *J Affect Disord*. 2009; 116:214-7.
31. Raison CL, Capuron L, Miller AH. Cytokines sing the blues: inflammation and the pathogenesis of depression. *Trends Immunol*. 2006; 27:24-31.
32. Jamrozinski K, Gruber O, Kemmer C, Falkai P, Scherk H. Neurocognitive functions in euthymic bipolar patients. *Acta Psychiatr Scand*. 2009; 119:365-74.
33. Offord J. Genetic approaches to a better understanding of bipolar disorder. *Pharmacol Ther*. 2011.
34. Sanches M, Soares JC. New drugs for bipolar disorder. *Curr Psychiatry Rep*. 2011; 13:513-21.

35. Aubert G, Lansdorp PM. Telomeres and aging. *Physiol Rev.* 2008; 88:557-79.
36. Moyzis RK, Buckingham JM, Cram LS, Dani M, Deaven LL, Jones MD, et al. A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988; 85:6622-6.
37. Amiard S, Doudeau M, Pinte S, Poulet A, Lenain C, Faivre-Moskalenko C, et al. A topological mechanism for TRF2-enhanced strand invasion. *Nat Struct Mol Biol.* 2007; 14:147-54.
38. Teixeira MT, Arneric M, Sperisen P, Lingner J. Telomere length homeostasis is achieved via a switch between telomerase- extendible and - nonextendible states. *Cell.* 2004; 117:323-35.
39. Griffith JD, Comeau L, Rosenfield S, Stansel RM, Bianchi A, Moss H, et al. Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell.* 1999; 97:503-14.
40. Mitchell JR, Wood E, Collins K. A telomerase component is defective in the human disease dyskeratosis congenita. *Nature.* 1999; 402:551-5.
41. Olovnikov AM. A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *J Theor Biol.* 1973; 41:181-90.
42. Makarov VL, Hirose Y, Langmore JP. Long G tails at both ends of human chromosomes suggest a C strand degradation mechanism for telomere shortening. *Cell.* 1997; 88:657-66.
43. von Zglinicki T. Role of oxidative stress in telomere length regulation and replicative senescence. *Ann N Y Acad Sci.* 2000; 908:99-110.
44. Autexier C, Lue NF. The structure and function of telomerase reverse transcriptase. *Annu Rev Biochem.* 2006; 75:493-517.
45. Cong YS, Wright WE, Shay JW. Human telomerase and its regulation. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2002; 66:407-25, table of contents.
46. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science.* 1994; 266:2011-5.
47. Simon NM, Smoller JW, McNamara KL, Maser RS, Zalta AK, Pollack MH, et al. Telomere shortening and mood disorders: preliminary support for a chronic stress model of accelerated aging. *Biol Psychiatry.* 2006; 60:432-5.
48. Elvsashagen T, Vera E, Boen E, Bratlie J, Andreassen OA, Josefsen D, et al. The load of short telomeres is increased and associated with lifetime number of depressive episodes in bipolar II disorder. *J Affect Disord.* 2011; 135:43-50.
49. Wolkowitz OM, Mellon SH, Epel ES, Lin J, Dhabhar FS, Su Y, et al. Leukocyte telomere length in major depression: correlations with chronicity, inflammation and oxidative stress--preliminary findings. *PLoS One.* 2011; 6:e17837.
50. Weiskopf D, Weinberger B, Grubeck-Loebenstien B. The aging of the immune system. *Transpl Int.* 2009; 22:1041-50.
51. Kaszubowska L. Telomere shortening and ageing of the immune system. *J Physiol Pharmacol.* 2008; 59 Suppl 9:169-86.
52. Effros RB, Boucher N, Porter V, Zhu X, Spaulding C, Walford RL, et al. Decline in CD28+ T cells in centenarians and in long-term T cell cultures: a

possible cause for both in vivo and in vitro immunosenescence. *Exp Gerontol.* 1994; 29:601-9.

53. Acuto O, Michel F. CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling. *Nat Rev Immunol.* 2003; 3:939-51.

54. Goronzy JJ, Fulbright JW, Crowson CS, Poland GA, O'Fallon WM, Weyand CM. Value of immunological markers in predicting responsiveness to influenza vaccination in elderly individuals. *J Virol.* 2001; 75:12182-7.

55. Weng NP, Akbar AN, Goronzy J. CD28(-) T cells: their role in the age-associated decline of immune function. *Trends Immunol.* 2009; 30:306-12.

56. Spaulding C, Guo W, Effros RB. Resistance to apoptosis in human CD8+ T cells that reach replicative senescence after multiple rounds of antigen-specific proliferation. *Exp Gerontol.* 1999; 34:633-44.

57. Weng NP, Levine BL, June CH, Hodes RJ. Regulated expression of telomerase activity in human T lymphocyte development and activation. *J Exp Med.* 1996; 183:2471-9.

58. Effros RB, Dagarag M, Spaulding C, Man J. The role of CD8+ T-cell replicative senescence in human aging. *Immunol Rev.* 2005; 205:147-57.

59. Yang OO, Lin H, Dagarag M, Ng HL, Effros RB, Uittenbogaart CH. Decreased perforin and granzyme B expression in senescent HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes. *Virology.* 2005; 332:16-9.

60. Ouyang Q, Wagner WM, Wikby A, Walter S, Aubert G, Dodi AI, et al. Large numbers of dysfunctional CD8+ T lymphocytes bearing receptors for a single dominant CMV epitope in the very old. *J Clin Immunol.* 2003; 23:247-57.

61. Schwab R, Szabo P, Manavalan JS, Weksler ME, Posnett DN, Pannetier C, et al. Expanded CD4+ and CD8+ T cell clones in elderly humans. *J Immunol.* 1997; 158:4493-9.

62. Vallejo AN. CD28 extinction in human T cells: altered functions and the program of T-cell senescence. *Immunol Rev.* 2005; 205:158-69.

63. Olsson J, Wikby A, Johansson B, Lofgren S, Nilsson BO, Ferguson FG. Age-related change in peripheral blood T-lymphocyte subpopulations and cytomegalovirus infection in the very old: the Swedish longitudinal OCTO immune study. *Mech Ageing Dev.* 2000; 121:187-201.

64. Wikby A, Johansson B, Olsson J, Lofgren S, Nilsson BO, Ferguson F. Expansions of peripheral blood CD8 T-lymphocyte subpopulations and an association with cytomegalovirus seropositivity in the elderly: the Swedish NONA immune study. *Exp Gerontol.* 2002; 37:445-53.

65. Badami KG, McQuilkan-Bickerstaffe S, Wells JE, Parata M. Cytomegalovirus seroprevalence and 'cytomegalovirus-safe' seropositive blood donors. *Epidemiol Infect.* 2009; 137:1776-80.

66. Pawelec G, Derhovanessian E. Role of CMV in immune senescence. *Virus Res.* 2011; 157:175-9.

67. Assy N, Gefen H, Schlesinger S, Karim W. Reactivation versus primary CMV infection after splenectomy in immunocompetent patients. *Dig Dis Sci.* 2007; 52:3477-9.

68. Just-Nubling G, Korn S, Ludwig B, Stephan C, Doerr HW, Preiser W. Primary cytomegalovirus infection in an outpatient setting--laboratory markers and clinical aspects. *Infection.* 2003; 31:318-23.

69. Wreghitt TG, Teare EL, Sule O, Devi R, Rice P. Cytomegalovirus infection in immunocompetent patients. *Clin Infect Dis*. 2003; 37:1603-6.
70. Almanzar G, Schwaiger S, Jenewein B, Keller M, Herndler-Brandstetter D, Wurzner R, et al. Long-term cytomegalovirus infection leads to significant changes in the composition of the CD8+ T-cell repertoire, which may be the basis for an imbalance in the cytokine production profile in elderly persons. *J Virol*. 2005; 79:3675-83.
71. Benedict CA, Loewendorf A, Garcia Z, Blazar BR, Janssen EM. Dendritic cell programming by cytomegalovirus stunts naive T cell responses via the PD-L1/PD-1 pathway. *J Immunol*. 2008; 180:4836-47.
72. Tabata T, Kawakatsu H, Maidji E, Sakai T, Sakai K, Fang-Hoover J, et al. Induction of an epithelial integrin α v β 6 in human cytomegalovirus-infected endothelial cells leads to activation of transforming growth factor- β 1 and increased collagen production. *Am J Pathol*. 2008; 172:1127-40.
73. Bentz GL, Jarquin-Pardo M, Chan G, Smith MS, Sinzger C, Yurochko AD. Human cytomegalovirus (HCMV) infection of endothelial cells promotes naive monocyte extravasation and transfer of productive virus to enhance hematogenous dissemination of HCMV. *J Virol*. 2006; 80:11539-55.

