



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS
HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
LABORATÓRIO DE PSIQUIATRIA MOLECULAR**

Dissertação de Mestrado:

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DAS PROTEÍNAS C3 E C4 EM
PACIENTES ESQUIZOFRÊNICOS, BIPOLARES E CONTROLES SAUDÁVEIS**

Lisiane dos Santos Sória

**ORIENTADOR
Flavio Kapczinski**

**PORTE ALEGRE
2011**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS
HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
LABORATÓRIO DE PSIQUIATRIA MOLECULAR**

Dissertação de Mestrado:

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DAS PROTEÍNAS C3 E C4 EM
PACIENTES ESQUIZOFRÊNICOS, BIPOLARES E CONTROLES SAUDÁVEIS**

Lisiane dos Santos Sória

*Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Medicina:
Ciências Médicas, da Universidade
Federal do Rio Grande do Sul, para
obtenção do título de Mestre em
Ciências Médicas.*

PORTO ALEGRE, MARÇO 2011

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por iluminar o meu caminho.

Ao meu marido Waldir pelas várias formas de ajuda e ao meu filho Noah pela sua recente existência.

Aos meus pais, João Mário e Maria de Lourdes que estiveram sempre presentes neste momento que mais necessitei, cuidando do meu filho Noah para que esta dissertação fosse possível.

Ao meu orientador, Prof. Flávio Kapczinski, pela oportunidade de compor sua equipe e fazer possível mais esta etapa de minha vida, meu eterno agradecimento.

A minha grande amiga, Keila Ceresér, pela atenção incondicional nos momentos que mais necessitei.

Ao Maurício Kunz que foi indispensável no momento final desta dissertação.

A Clarissa Gama que fez possível a definição do tema desta dissertação.

A todos do grupo de pesquisa do Laboratório de Psiquiatria Molecular, que sempre me estenderam a mão quando foi necessário.

Aos pacientes e voluntários que participaram do estudo

Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

SUMÁRIO

RESUMO.....	5
1 INTRODUÇÃO.....	7
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	11
2.1 A Fisiopatologia da Esquizofrenia.....	11
2.2 A Fisiopatologia do Transtorno de Humor Bipolar.....	13
2.3 Esquizofrenia, Transtorno de Humor Bipolar e Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro.....	15
2.4 Esquizofrenia, Transtorno de Humor Bipolar e Citocinas.....	16
2.5 Esquizofrenia, Transtorno de Humor Bipolar e Estresse Oxidativo.....	21
2.6 Inflamação e Sistema Complemento.....	24
3. OBJETIVOS.....	29
3.1 Objetivo Primário.....	29
3.2 Objetivos Secundários.....	29
4. ARTIGO SUBMETIDO.....	30
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	44
6. REFERÊNCIAS.....	45

RESUMO

Introdução: Evidências sugerem o envolvimento do Sistema Complemento (SC) na patogenia da esquizofrenia (SZ) e do Transtorno de Humor Bipolar (THB). O SC é um sistema efetor importante na imunidade inata, sendo o Complemento 3 (C3) uma proteína central nas três vias distintas que podem levar a sua ativação.

Objetivos: Comparar níveis de C3 e C4 entre pacientes com SZ crônicos estabilizados, pacientes com THB eutímicos e controles saudáveis pareados por sexo e idade.

Metodologia: Recrutamos 53 pacientes com SZ, 20 pacientes com THB eutímicos e 80 voluntários saudáveis. Os pacientes preencheram critérios do DSM-IV para diagnóstico, e as condições psiquiátricas foram determinadas pelas escalas BPRS e CGI para SZ, e YMRS e HAMD para THB. Foram coletados 5 ml de sangue sem anticoagulante de cada participante, e os níveis de C3 e C4 foram quantificados no soro pelo método de nefelometria. As análises descritivas foram apresentadas como média \pm DP ou mediana e valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. As relações entre as variáveis foram avaliadas através da correlação de Spearman.

Resultados: C3 foi significativamente maior em pacientes com SZ quando comparada com controles ($p < 0,011$) ou eutímicos ($p < 0,011$). Níveis de C3 não foram diferentes nos controles em comparação com pacientes com THB eutímicos ($p = 0,998$). Não houve diferença significativa nos níveis séricos de C4 entre os três grupos ($p = 0,164$). Nenhuma correlação foi encontrada em pacientes com SZ entre dose de antipsicóticos e C3 ($p = 0,613$) ou C4 ($p = 0,668$).

Conclusões: Nossos resultados sugerem a ativação do sistema complemento na SZ, indicado pelo aumento dos níveis de C3. Tal ativação provavelmente está ocorrendo pela via alternativa, uma vez que não houve aumento significativo nos níveis de C4.

LISTA DE SIMBOLOS E ABREVIATURAS

AH50 - Fração da via alternativa do complemento
APA- Associação Psiquiátrica Americana
BDNF- Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
BPRS - Escala Breve de Avaliação Psiquiátrica
AMPc – Monofosfato de 3',5'-Adenosina cíclico
C3H50 e C4H50 - Componentes do complemento
CAT - Catalase
CGI - Escala de impressão clínica global
CPF – Côrtex Pré-Frontal
CREB - Proteína ligada ao fator de transcrição do AMPc
DNA – Ácido Desoxirribonucléico
DSM – Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais
ECT - Eletroconvulsoterapia
EO - Estresse Oxidativo
ERO - Espécie reativa de oxigênio
GSH-Px - Glutationa Peroxidase
HAM-D - Escala de Avaliação de Depressão de Hamilton
HCPA – Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HPA – Eixo Hipotálamo-Pituitária (hipófise)-Adrenal
IFN - Interferon
IL – Interleucina
NGF – Fator de Crescimento do Nervo
NK - Células extermadoras naturais
O₂ - Radical superóxido
PCR - Proteína C reativa
PET – Tomografia por Emissão de Pósitrons
RE - Retículo Endoplasmático
RL - Radicais Livres
RNA – Ácido Ribonucléico
SNC - Sistema Nervoso Central
SOD - Superóxido Dismutase
SZ - Esquizofrenia
TBARS - Ácido tiobarbitúrico
THB - Transtorno de Humor Bipolar
TGF - Fator de crescimento tumoral
Th - Linfócito
TNF - Fator de necrose tumoral
TrkB- Proteína Tirosina Quinase B
UFRGS - Universidade Federal do Rio Grande do Sul
YMRS - Escala de Avaliação de Mania de Young

1. INTRODUÇÃO

A Esquizofrenia (SZ) é uma doença que acomete cerca de 1% da população e que se caracteriza por ser grave e produzir um deterioro no funcionamento cognitivo do indivíduo. É uma doença com alta taxa de cronicidade, caracterizada por distorções do pensamento, delírios bizarros, alterações na sensopercepção e respostas emocionais inadequadas, que podem levar o paciente a algum grau de deterioração. Critérios diagnósticos claros baseados em características fenomenológicas são apresentados no DSM IV (APA,1994).

O DSM IV descreve os seguintes critérios diagnósticos para a esquizofrenia:

A. Sintomas característicos: dois ou mais dos seguintes, cada qual presente por uma porção significativa de tempo durante o período de um mês (ou menos, se tratados com sucesso):

- (1) delírios
- (2) alucinações
- (3) discurso desorganizado (por ex. frequente descarrilhamento ou incoerência)
- (4) comportamento amplamente desorganizado ou catatônico
- (5) sintomas negativos, isto é, embotamento afetivo, alogia ou avolição

Nota: Apenas um sintoma do critério A é necessário se os delírios são bizarros ou as alucinações consistem de vozes que comentam o comportamento ou os pensamentos da pessoa, ou duas ou mais vozes conversando entre si.

B. Disfunção social/ocupacional: por uma porção significativa do tempo desde o início da perturbação, uma ou mais áreas importantes do funcionamento, tais como trabalho, relações interpessoais ou cuidados pessoais, estão acentuadamente abaixo do nível alcançado antes do início (ou, quando o início dá-se na infância ou adolescência, fracasso em atingir o nível esperado de aquisição interpessoal, acadêmica ou ocupacional).

C. Duração: sinais contínuos da perturbação persistem por pelo menos seis meses. Este período de seis meses deve incluir pelo menos um mês de sintomas (ou menos, se tratados com sucesso) que satisfazem o critério A (isto é, sintomas da fase ativa) e pode incluir períodos de sintomas prodrômicos ou residuais.

Durante esses períodos prodrômicos ou residuais, os sinais da perturbação podem ser manifestados apenas por sintomas negativos ou por dois ou mais sintomas relacionados no Critério A presentes de uma forma atenuada (por ex., crenças estranhas, experiências perceptuais incomuns).

D. Exclusão de Transtorno Esquizoafetivo e Transtorno de Humor: o transtorno esquizoafetivo e o transtorno de humor com aspectos psicóticos foram descartados, porque (1) nenhum episódio depressivo maior, maníaco ou misto ocorreu concomitantemente aos sintomas da fase ativa; ou (2) se os episódios de humor ocorreram durante os sintomas da fase ativa, sua duração total foi breve relativamente à duração dos períodos ativo e residual.

E. Exclusão de substância/condição médica geral: a perturbação não se deve aos efeitos fisiológicos diretos de uma substância (por ex., uma droga de abuso, um medicamento) ou uma condição médica geral.

F. Relação com um transtorno invasivo do desenvolvimento: se existe uma história de transtorno autista ou um outro transtorno invasivo do desenvolvimento, o diagnóstico adicional de esquizofrenia é feito apenas se delírios ou alucinações proeminentes também estão presentes por pelo menos um mês (ou menos, se tratados com sucesso).

Classificação do curso longitudinal (pode ser aplicada apenas um mês após o aparecimento inicial dos sintomas de fase ativa):

- Episódico com sintomas residuais entre episódios (episódios são definidos pelo ressurgimento de sintomas psicóticos proeminentes); especificar também se:
 - Com sintomas negativos proeminentes
 - Episódico sem sintomas residuais entre episódios
 - Contínuo (sintomas psicóticos proeminentes estão presentes durante todo o período de observação); especificar também se: com sintomas negativos proeminentes
 - Episódio único em remissão parcial; especificar também se; com sintomas negativos proeminentes
 - Episódio único em remissão completa

- Outro padrão ou padrão inespecífico.

A Esquizofrenia costuma ocorrer no final da adolescência e início da vida adulta, afetando ambos os sexos. A patologia tende a interferir no desempenho escolar e profissional destes pacientes que terão dificuldade de ingressar na universidade e até concluir estudos, além de dificuldade de assumir posições de trabalho que exijam maior responsabilidade. Como resultado, o status sócio-econômico destes pacientes é reduzido.

No momento, não é possível prevenir a esquizofrenia. Dessa forma, o foco comum é o tratamento e a reabilitação do paciente. A farmacoterapia tem provado ser o ponto chave na terapêutica da esquizofrenia. Embora não curativos, os fármacos antipsicóticos se estabeleceram como o tratamento primário para todos os estágios da doença, possibilitando uma redução no tempo de hospitalização e a possibilidade de manutenção dos pacientes por mais tempo em seus lares (Marder et al., 1991).

Mais de 20% de todos os pacientes se mantêm refratários ao tratamento com antipsicóticos clássicos (Davis, 1980; Haring et al., 1990)

A causa da Esquizofrenia é desconhecida tendo muitas hipóteses etiológicas como: fatores genéticos, epidemias virais durante a gestação, época de nascimento, traumatismos de parto, infecções perinatais, condições neurológicas ou neuropsiquiátricas que geram sintomas tipo esquizofrênicos ou desenvolvimento anormal (avaliados por testes psicológicos, estudos de neuroimagem e neuropatológicos que sugerem alterações no desenvolvimento cerebral.

O Transtorno do Humor Bipolar (THB) é uma doença que acomete cerca de 1% da população, podendo esta taxa elevar-se a 8%, variando de acordo com os critérios diagnósticos utilizados nos estudos (Judd et al., 2002). Está associado a um alto índice de suicídio e desemprego (Weissman et al., 1996; Müller-Oerlinghausen, Berhofer e Bauer 2002; Grant et al., 2005). O Epidemiological Catchment Area (ECA-NIMH) (Weissman et al., 1996), conduzido nos Estados Unidos a partir de 1980, com amostra de aproximadamente 20 mil pessoas, mostrou uma taxa de prevalência de 0,8% do THB tipo I. Já no Brasil foi

encontrada a prevalência de 0,7% na população de Porto Alegre/RS (Almeida Filho et al., 1997).

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde, o THB é considerado a sexta causa de incapacidade entre as condições médicas e psiquiátricas em pessoas com 15 a 44 anos (Lopez e Murray, 1998).

O THB caracteriza-se por ser uma patologia crônica, com curso episódico, mas altamente variável, com potencial para alto grau de severidade, recorrência e intensidade (Tohen and Angst, 2002).

Mesmo com todo avanço alcançado até hoje, o THB permanece uma doença recorrente, com curso bastante heterogêneo, predominantemente depressivo. Alguns pacientes ficam estáveis e outros experimentam episódios freqüentes, estados mistos (sintomas maníacos e depressivos concomitantemente) e complicações relacionadas ao abuso de substâncias e prejuízo cognitivo acentuado. O prejuízo causado pela doença parece estar mais relacionado com a recorrência dos episódios do que a gravidade de um dado episódio. (Post et al., 2003). Comumente os pacientes apresentam períodos de exacerbação dos sintomas (episódios agudos) intercalados por períodos subsindrônicos e períodos de remissão (eutimia). A média de tempo entre o aparecimento dos primeiros sintomas e o primeiro tratamento é de aproximadamente dez anos (Leverich e Post, 2006). Em um estudo de seguimento, que acompanhou pacientes bipolares tipo I por um período médio de 13 anos, observou-se que os pacientes permaneceram metade deste período sintomáticos (Judd et al., 2002).

Antes do surgimento dos psicofármacos, os episódios duravam de 4 a 13 meses, os intervalos assintomáticos ficavam mais curtos e os episódios mais longos com a progressão da doença. (Angst and Sellaro, 2000). A persistência de sintomas subsindrônicos está associado a um maior risco de reagudização da doença (Perlis et al., 2006).

A ocorrência de pelo menos um episódio maníaco ou hipomaníaco durante a vida é suficiente para a identificação do THB, na qual a presença de episódio maníaco confere o diagnóstico de THB tipo I, enquanto a presença de episódio

hipomaníaco, sem a ocorrência de episódio maníaco, confere o diagnóstico de THB tipo II (APA, 2000; Belmaker, 2004). O THB tipo I é caracterizado por um ou mais episódios maníacos ou mistos, geralmente acompanhados por episódios depressivos maiores, enquanto que no THB tipo II não ocorrem episódios maníacos somente ocorrem episódios hipomaníacos (APA, 2002)

O episódio maníaco é definido, segundo a Associação Psiquiátrica Americana (APA, 2000), por um período distinto de humor anormal e persistentemente elevado, expansivo ou irritável, acompanhado por pelo menos três dos seguintes sintomas (quatro se humor irritável):

- Grandiosidade ou auto estima inflada;
- Taquilalia ou pressão da fala;
- Diminuição da necessidade de sono;
- Experiência subjetiva de que os pensamentos estão correndo ou fuga de idéias;
- Distratibilidade;
- Alteração do comportamento dirigido para atividades prazerosas, frequentemente imprudentes ou perigosas;
- Agitação psicomotora.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 A Fisiopatologia da Esquizofrenia

A fisiopatologia da SZ pode ser resultante de uma desregulação na plasticidade sináptica (Gratacos et al.; 2007) por alterações de neurotrofinas (Gama et al., 2007; Vargas et al., 2008), radicais livres (Gama et al., 2006, 2008) e processos inflamatórios (Reddy et al., 1996).

Alterações do sistema imune têm sido reportadas na esquizofrenia, incluindo inflamação, ativação da micróglio em líquido cefalorraquidiano (Radewics et al., 2000), presença de anticorpos contra estruturas cerebrais (Henneberg et al., 1994; Mayilyan and Poghosyan, 2001) e aumento nos níveis de diversas citocinas

procedendo episódios psicóticos, com aumento da ativação de linfócitos T-helper (Rothermundt et al., 2001).

É também conhecida a alta incidência de processos inflamatórios em pacientes esquizofrênicos. Em uma revisão realizada por Potvin e colaboradores (2008) foram encontradas evidências de uma relação entre esquizofrenia e processo inflamatório. Há indícios de que o sistema complemento está ativado em várias doenças neuro degenerativas, com evidências incipientes de que o sistema complemento está envolvido na esquizofrenia, com ativação das vias clássica e da manose, possivelmente contribuindo para sua etiopatogênese por neurotoxicidade e apoptose neuronal (Mayilyan et al., 2006), uma vez que perda neuronal poderia ser um dos fatores implicados na esquizofrenia.

Os processos apoptóticos alteram a rede de conexão neuronal e estão envolvidos na patogênese de diversas doenças neurodegenerativas, entre elas a esquizofrenia (Kalinichenko and Matveeva, 2008).

A apoptose é regulada por uma cascata do complexo molecular que controla a ativação da família da cisteína protease, conhecida como proteína caspase (Friedlander, 2003). A regulação alterada da cascata apoptótica pode reduzir potencialmente a viabilidade neuronal e glial de vários estágios do desenvolvimento e contribuir para o *deficit* volumétrico e funcional do cérebro, observado na esquizofrenia (Berger et al., 2003; Jarskog et al., 2005).

Células apoptóticas são conhecidas como potentes ativadores do sistema complemento, particularmente a via alternativa, e, por outro lado, a proteína C3, é uma das proteínas do complemento que está diretamente responsável pela opsonização das células apoptóticas.

Boyajyan e colaboradores (2010), propõem que a hiperativação da via alternativa do complemento em esquizofrenia é estimulada pelas células apoptóticas. Além disso, esse achado, fornece suporte adicional a nossa hipótese sobre o efeito estimulatório de células apoptóticas sobre a via alternativa do complemento na esquizofrenia e como os neurolépticos têm se mostrado potentes indutores de apoptose. Esta hipótese é consistente com a diferença nos níveis

sanguíneos em ambos, AH50 and C3H50, entre pacientes drug-free e medicados sugerindo um efeito ativador dos neurolépticos na via alterantiva.

2.2 A Fisiopatologia do Transtorno de Humor Bipolar

Anteriormente se acreditava que, diferentemente da esquizofrenia, os pacientes com THB não apresentavam diminuição das funções cognitivas e eram capazes de retornar ao seu funcionamento anterior, quando cessados os episódios agudos da doença (Kraepelin, 2001). Entretanto, estudos atuais permitem verificar que pacientes bipolares, mesmo em períodos de remissão da doença, apresentam um importante deterioro em suas atividades laborais e sociais, bem como em seu funcionamento cognitivo (Frangou et al., 2005; Martinez-Arán et al., 2007).

Estudos recentes realizados por Deep et al (2006) têm demonstrado, que o THB está associado a uma substancial desabilidade com similar severidade à encontrada na esquizofrenia.

Atualmente o campo de investigação, dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos na etiologia do THB e da esquizofrenia é vasto com achados que parecem muitas vezes se entrecruzarem entre estes dois diagnósticos.

A fisiopatologia do THB bem como da SZ não está totalmente esclarecida, no entanto, existem fortes indícios do envolvimento de vários mecanismos regulatórios do organismo. Pouco ainda se sabe sobre a etiologia e neurobiologia do THB e os fatores envolvidos nas bases biológicas incluem a genética, vias neuro-hormonais, neurotransmissão, vias de transcrição de sinal, regulação da expressão gênica, alterações do sistema imunológico, estresse oxidativo e neuroplasticidade.

Estudos com gêmeos demonstram que no THB há uma concordância de 70% entre monozigóticos e cerca de 30% em dizigóticos (Kelsoe, 2003).

Estudos familiares, estudos com gêmeos e estudos de adoção demonstram claramente que a hereditariedade genética é um dos fatores determinantes para o desenvolvimento da doença (Craddock and Jones, 1999). Comparado à outras doenças a hereditariedade do THB é maior do que a do câncer de mama e do

diabetes tipo II, sendo que o risco de um familiar em primeiro grau de um sujeito afetado em desenvolver a doença é 10 vezes maior que o risco da população em geral (Craddock, o'Donovan e Owen, 2005).

Pearlson (1999) revelou anormalidades estruturais no cérebro de indivíduos com THB, em estudos de iamgem de cérebro pos-mortem, que incluem redução no volume do córtex pré-frontal (CPF) e hipocampo em exames de ressonância magnética. Ainda Pearlson e Veroff relataram alargamento de ventrículos em jovens com THB. Estes estudos indicam que atrofia neuronal e perdas celulares podem contribuir para a fisiopatologia da depressão e THB (Kapczinski et al., 2008).

Estudos neurofuncionais baseados em ressonância magnética funcional e tomografia por emissão de pósitrons (PET) apontam para uma diminuição significativa do metabolismo do CPF durante a depressão um e aumento em algumas regiões durante fase maníaca (Malhi et al., 2004; Strakowski, DelBello e Adler, 2005). Ainda assim, a diminuição do metabolismo do CPF parece estar acompanhada de um aumento no metabolismo da amígdala e do estriado, sugerindo que alterações no circuito que compreende o CPF, sistema límbico e gânglios da base podem estar associadas a fisiopatologia do THB.

Estudos conduzidos em tecido pos-mortem, nesta mesma linha, revelaram que indivíduos bipolares apresentam uma diminuição significativa de células neuronais e gliais no CPF dorsolateral e no CPF subgenual (Öngur, Drevets e Price, 1998; Rajkowska, Halarie e Selemon, 2001; Bouras et al., 2001).

Estudos têm demonstrado que antidepressivos e estabilizadores de humor atuam modulando diversas cascatas de sinalização celulares envolvidas em neuroplasticidade e sobrevivência neuronal (Manji, Drevets e Charney, 2001; Schaltiel, Chen e Manji, 2006). A primeira evidência deve-se a Duman, que demonstrou que o uso crônico de antidepressivos e de ECT aumentam a expressão do RNAm do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), do seu receptor TrkB (receptor tirosina-quinase B) e do fator de transcrição nuclear CREB (cAMP response element binding) em hipocampo de ratos (Nibuya, Morinobu e Duman 1995; Nibuya, Nestler e Duman, 1996). Posteriormente, estudos pré-

clínicos demonstraram que o tratamento crônico com lítio e valproato também são capazes de aumentar a expressão do BDNF no córtex frontal e hipocampo (Fukumoto et al., 2001; Einat et al., 2003).

Atualmente acredita-se que os transtornos de humor estão associados a alterações no sistema de comunicação entre os circuitos cerebrais reguladores do humor, e que antidepressivos e estabilizadores de humor ativariam cascatas de sinalização que regulam a plasticidade e sobrevivência celular, com subsequente melhora gradativa da transmissão da informação nestes circuitos cerebrais (Manji, Drevets e Charney, 2001; Nestler et al., 2002; Coyle e Duman, 2003; Castrén, 2005).

2.3 Esquizofrenia, Transtorno de Humor Bipolar e Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro

O Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF – Brain-Derived Neurotrophic Factor) é considerado a principal neurotrofina cerebral onde modula diferentes funções sinápticas, estimulando a maturação, a nutrição, a integridade neuronal e o crescimento, com um papel fundamental no desenvolvimento e no funcionamento dos neurônios serotoninérgicos centrais. O BDNF apresenta expressão abundante nas áreas do hipocampo, do neocôrtex, do cerebelo e da amígdala (Shimizu et al., 2003).

Além de alterações nos genes e nos níveis do BDNF terem sido relacionadas aos transtornos de humor e ao estresse, há, também, alterações dos níveis séricos em diferentes neurotrofinas, sobretudo nos episódios agudos de THB (Rattiner et al., 2005).

A diminuição dos níveis de BDNF tem sido descrita em pacientes deprimidos (Shimizu et al., 2003). Dados recentes sugerem o envolvimento do BDNF na fisiopatologia do THB. Observa-se uma correlação inversa dos níveis séricos de BDNF com a gravidade dos sintomas maníacos e depressivos (Cunha et al., 2006).

Em um modelo de mania com camundongos, verificou-se que a administração de anfetamina diminuiu os níveis séricos de BDNF, enquanto que o uso de lítio e valproato aumentaram esses níveis (Frey et al., 2006). Níveis séricos de BDNF encontram-se reduzidos durante os episódios agudos de mania e de depressão no THB (Cunha et al., 2006).

2.4 Esquizofrenia, Transtorno de Humor Bipolar e Citocinas

Citocina é um termo genérico que designa um grupo de moléculas envolvidas na emissão de sinais entre as células durante a ativação das respostas imunes. As citocinas são pequenas proteínas ou peptídeos liberadas por várias células do organismo, normalmente em resposta a um estímulo ativador, induzindo resposta por meio de ligações a receptores específicos. As citocinas englobam as interleucinas, quimiocinas, interferonas, fatores estimuladores de colônia, fatores de crescimento e TNFs.

As citocinas classificadas de acordo com a sua ação são as pró-inflamatórias, no sentido que aumentam a resposta imune a infecções e inflamação promovendo o recrutamento leucocitário aos locais de inflamação e através da ativação de células inflamatórias ou anti-inflamatórias, que contribuem para a redução da resposta inflamatória. As citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, TNF-alfa e IFN- γ) ativam os macrófagos, células NK, células T e células B e a proliferação de imunoglobulinas. As citocinas anti-inflamatórias (IL-1RA, IL-4, IL-10, IL-13, TGF-beta) reduzem a resposta inflamatória por meio da diminuição das citocinas pró-inflamatórias e da supressão de monócitos (Marques et al., 2007).

As citocinas também podem ser classificadas pela fonte de produção do linfócito T helper 1 (Th-1) ou T helper 2 (Th-2). Os linfócitos Th1 liberam citocinas que ampliam a resposta imunológica celular e são principalmente pró-inflamatórias, enquanto que os linfócitos Th-2 liberam citocinas que ampliam a resposta humoral e são principalmente anti-inflamatórias.

As citocinas TNF-alfa, IL-1 e IL-6 estimulam os hepatócitos a produzir RNAm para a produção da proteína C reativa (PCR), uma das proteínas de fase aguda.

As citocinas são reguladores centrais do crescimento e diferenciação de leucócitos. Os leucócitos podem ser ativados por lesão tecidual, necrose ou isquemia ou pela presença de agente infeccioso e, ativados estimulam a produção de interleucinas.

Citocinas agem numa variedade maior de alvos celulares do que hormônios e não são produzidas por células de glândulas especializadas, mas sim por células do próprio sistema imune. No entanto, são produzidas por células do sistema nervoso, em particular por células da glia (Goncharova et al. 2007).

Existe uma relação entre níveis de citocinas em fluidos corporais humanos e patogênese de diferenças doenças. Outros estudos também evidenciaram que algumas citocinas podem induzir apoptose em células cancerígenas (Wall et al., 2003).

Ao se estudar a relevante base de conhecimento da neuroimunologia, ênfase particular deve ser dada quanto à bidirecionalidade da interação neuro-imune. Esses sistemas complexos interagem em múltiplos níveis, tanto neuroendócrinos (eixo hipotálamo-hipófise-adrenal) e neurais (inervação simpática direta de órgãos linfóides), e estão envolvidos no controle da resposta imunológica tanto humoral como celular (Wrona, 2006). O sistema imune, por sua vez, influencia o sistema nervoso central primariamente através de citocinas.

Segundo os achados de que a administração de certas citocinas pode induzir alterações de parâmetros endócrinos que estão sob controle neural, um grande número de estudos demonstrou que receptores para algumas dessas citocinas estão presentes no SNC. Receptores funcionais de citocinas (em particular IL-1) são encontrados em astrócitos, micróglia, oligodentrócitos e na maioria dos neurônios (Cunningham et al., 1992; Otero & Merril, 1994; Rothwell & Hopkins, 1995).

De acordo com (Brebner et al. 2000), as interleucinas pró-inflamatórias IL-1, IL-6 e TNF-alfa influenciam atividade neuro endócrina, promovem alterações de

neurotransmissores centrais e induzem uma constelação de sintomas comportamentais, sugerindo uma influência em comportamentos complexos como estados de humor, através da ativação imune mediada pelas citocinas. Foi demonstrado por (Savino and Dardenne, 2000) que citocinas também governam importantes propriedades de neurônios, incluindo mecanismos de sobrevivência e apoptose.

Segundo Masek e colaboradores (2003) há evidência crescente sugerindo que os sistemas imunológico, endócrino e nervoso interagem uns com os outros através de citocinas, hormônios e neurotransmissores. A ativação dos sistemas de citocinas pode estar envolvida nas alterações neuropatológicas que ocorrem no sistema nervoso central de pacientes SZ. Numerosos estudos relatam que o tratamento com fármacos antipsicóticos afeta a rede de citocinas. Por isso, é plausível que a influência dos antipsicóticos sobre os sistemas que envolvem as citocinas podem ser responsáveis por sua eficácia clínica na SZ.

A ativação do sistema imune provoca febre, alterações comportamentais e neuroendócrinas e podem estar envolvidos em alterações neuropatológicas que ocorrem no SNC (De Simoni and Imeri, 1998). Esses efeitos são em grande parte, mediados por citocinas, cujos receptores estão constitutivamente expressos em neurônios e células gliais (Sawada et al., 1993, 1995; Szelenyi, 2001). Existem inúmeros estudos reportando que o tratamento com fármacos antipsicóticos afeta a rede de citocinas (Pollmächer et al., 1996). Por outro lado, uma série de alterações das citocinas foi encontrado na fase aguda e crônica da SZ (Schuld et al., 2004).

Conforme Barak e colaboradores (1995), o único estudo a investigar os níveis de sIL-2R no compartimento intratecal relataram valores diminuídos no líquido cefalorraquidiano (LCR), mas concentrações aumentadas no soro de pacientes SZ. Estes resultados indicaram a ativação imune sistêmica na SZ, no entanto, foram necessárias mais provas para apoiar esta conclusão.

Dois estudos demonstraram uma associação positiva dos níveis de IL-6, com a duração da doença (Ganguli et al., 1994; Kim et al., 2000).

Outra abordagem foi apresentada no estudo de Toyooka et al. (2003), em que media proteína e/ou níveis de mRNA para IL-1beta e antagonista do receptor IL-1 (IL-1Ra) nos tecidos post mortem de cérebros de pacientes SZ. Eles encontraram diminuição dos níveis de proteína bruta IL-1Ra e RNAm no córtex pré-frontal dos pacientes, enquanto os níveis de IL-1 não foram alterados. No mesmo estudo, eles encontraram o aumento dos níveis séricos de IL-1Ra em pacientes SZ livre de drogas. Foi sugerido que a diminuição dos níveis de IL-1Ra no SNC pode aumentar a IL-1 em pacientes SZ.

Receptores de citocinas também existem em forma solúvel, como o receptor solúvel da IL-2 (sIL-2R), que é liberado da superfície da membrana de células imunes ativadas e pode inibir a atividade biológica da IL-2, um importante fator de crescimento para células T, por impedir sua ligação com receptores ancorados de membrana. Assim, sIL-2R é visto como marcador de ativação imunológica. Em contraste, a ligação do receptor solúvel da IL-6 (sIL-6R) com a IL-6 forma um complexo que aumenta a atividade biológica da própria IL-6. A ação de citocinas pode também ser inibida por antagonistas de receptores que ocorrem naturalmente, como o antagonista da IL-1 (IL-Ra), que é produzido em resposta a vários estímulos inflamatórios, incluindo IL-1 e IL-6 (Raison and Miller, 2004).

Dentre alguns resultados apresentados a partir do estudo das citocinas as mais frequentemente estudadas na SZ tem sido a IL-2 e IL-6. Apesar da evidência na diminuição de níveis de IL-2 na SZ (Arolt et al., 2000; Bessler et al., 1995), outros estudos não confirmam essa tendência (Kaminska et al., 2001), enquanto outros ainda mostram uma relação inversa (Ebrinç et al., 2002). Em relação ao IL-6 os resultados mais consistentes, no que diz respeito ao aumento nos níveis de IL-6 (Maes et al., 2000; Shintani et al., 1991)

Recentemente, uma metanálise incluiu 62 estudos que avaliaram citocinas em sz (Potvin et al. 2008). Aumentos significativos foram confirmados para IL-1Ra, sIL-2R e IL-6, corroborando a existência de um processo inflamatório contínuo na SZ. Nos casos da IL-6 e IL-1Ra, em especial, as alterações observadas não parecem relacionadas ao uso de medicações antipsicóticas.

Alguns estudos demonstram o envolvimento das citocinas pró-inflamatórias em pacientes com transtorno de humor bipolar. Kim e colaboradores (2007) encontraram aumento da produção de interleucina-6 (IL-6) e de Fator de Necrose Tumoral (TNF-) em pacientes maníacos quando comparados a um grupo controle de pacientes não bipolares. Após seis semanas de tratamento os níveis de IL-6 e de TNF haviam retornado à linha de base; os níveis de TNF, no entanto, se mantinham elevados.

Alguns dos genes responsáveis pela produção de citocinas pró-inflamatórias estão localizados no cluster IL-1 do cromossomo 2q13. As citocinas pró-inflamatórias estão envolvidas no desenvolvimento embrionário do sistema nervoso central, promovendo proliferação e produção de citocinas e fatores neurotróficos, como o fator de crescimento neuronal (NGF) em astrócitos e inibindo a expressão do (BNDF) (Potter et al., 1999). Além de alterações das citocinas no THB também existem pesquisas que demonstram alterações com a esquizofrenia. Há uma pesquisa demonstrando que alterações no cluster IL-1 estão associadas com risco genético de esquizofrenia (Papiol et al., 2004), indicando um possível envolvimento do sistema imune na etiopatogenia da esquizofrenia.

O' Brien e colaboradores (2006) encontraram associação estatisticamente significativa entre mania e depressão bipolar e níveis elevados de TNF mesmo com os pacientes em uso de medicação psiquiátrica. Os mesmos autores relacionaram os níveis plasmáticos de citocinas com os de cortisol e demonstraram que esses se correlacionavam com os níveis de outra citocina pró-inflamatória (IL-10) tanto na mania quanto na depressão bipolar, embora os níveis de cortisol plasmático não diferissem entre maníacos, deprimidos e controles. As moléculas de citocina quando chegam ao cérebro interagem com vias específicas envolvidas no controle do humor como o eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (HPA) e neurotransmissores como a serotonina (Pasic et al., 2003).

Embora o local exato de atuação das citocinas no cérebro ainda não esteja determinado, estudos em roedores identificaram uma alta densidade de receptores de TNF no hipocampo e no hipotálamo. Esses receptores são

expressos tanto por neurônios quanto pelas células da glia, tanto que a expressão desses receptores aumenta significativamente em condições inflamatórias (Pasic et al., 2003).

Evidencia-se que um número menor de estudos examinou inflamação durante a depressão bipolar, no entanto, o aumento de diversos marcadores pró-inflamatórios parece se sobrepor ao observado na mania, incluindo-se aí sIL-2R, IL-6, IL-8 CRP e TNF-alfa (Kim et al., 2004; Middle et al. 2000). Por fim, existe evidência preliminar de aumentos de IL-1beta e IL-6 durante a depressão em relação à mania e aumentos de sIL-2R, IL-4 e CRP durante a mania em relação à depressão (Papiol et al., 2004; Rapaport and Manji, 2001)

2.5 Esquizofrenia, Transtorno de Humor Bipolar e Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo (EO) ocorre quando há um desequilíbrio entre os compostos oxidantes e antioxidantes do organismo, ou seja, quando os radicais livres (RL) são produzidos em quantidades excessivas ou os sistemas de defesa antioxidante são ineficientes nestas condições. Os RL produzidos em excesso reagem com carboidratos, proteínas, DNA e lipídeos. O RL mais comum é chamado superóxido (O_2^-), sendo produzido quando a molécula de oxigênio ganha um elétron de outra substância. Este radical causa elevação dos níveis intracelulares de cálcio, através da liberação de seus depósitos mitocondriais. Esta alteração gera mudanças na transdução de sinal intracelular e na expressão gênica, podendo ocasionar lesão celular. Os RL podem causar disfunção ou morte neuronal (Gilgun-Sherki Y et al., 2002).

Embora a principal função da mitocôndria seja a produção de energia das células, elas também geram espécies reativas de oxigênio (EROs) (Leeuwenburgh and Heinecke, 2001).

O SNC é suscetível a danos oxidativos, pois apresenta grande atividade energética mitocondrial dependente de oxigênio, associada à elevada concentração de ferro livre e lipídeos poli-insaturados, e baixos níveis de glutationa e enzimas antioxidantes. (Coskun et al., 2005). O córtex frontal e o

hipocampo têm alta concentração de ferro, que se torna potencialmente tóxico ao SNC em situações de estresse oxidativo. (Bostanci et al., 2006).

Em resposta a ação dos RL, o organismo possui um sistema de defesa anti-oxidante. Os principais representantes desse sistema são as enzimas superóxido-desmutase (SOD), a catalase (CAT), glutationa peroxidase (GSH-Px), sendo a SOD a mais amplamente distribuída enzima antioxidante do cérebro. (Scarpa et al., 1987).

Aumento nos níveis de estresse oxidativo neuronal produz efeitos deletérios na transdução de sinal, plasticidade estrutural e resistência celular, principalmente por induzir a peroxidação lipídica nas membranas e danos diretos em proteínas e genes (Andreazza e tal., 2008).

Ácido tiobarbitúrico (TBARS) é um indicador direto de peroxidação lipídica (Reddy and Yao, 1996). Stress oxidativo e alterações em enzimas antioxidantes têm sido descritas na fisiopatologia da SZ.

A peroxidação lipídica, avaliada pelos níveis de TBARS, mostrou estar aumentado em pacientes com SZ medicados cronicamente e naqueles que apresentam sintomas psicóticos marcantes (Gama et al., 2008). Gama e colaboradores (2008), ainda encontraram níveis altos de TBARS em soro de pacientes com SZ utilizando clozapina quando comparado com o tratamento com o haloperidol, podendo indicar a gravidade da doença neste grupo. Em contraste com estes resultados Parikh et al. (2003), encontrou aumento nos níveis de peroxidação no cérebro de ratos cronicamente tratados com haldol. Mas não nos cronicamente tratados com risperidona, olanzapina e clozapina.

Níveis altos de SOD, uma enzima chave na defesa antioxidante, está relatado em pacientes com SZ. (Gama et al., 2006). Também níveis altos de SOD foram relatados em pacientes sz livre de neurolépticos e foram associados com sintomas positivos. (Zhang et al., 2003).

Gama et al. (2008) encontrou níveis altos de SOD e TBARS em pacientes SZ medicados cronicamente mas não encontrou diferença na atividade da SOD nos três diferentes cursos clínicos, com remissão parcial dos sintomas psicóticos, sintomas psicóticos marcantes e deterioro. A correlação positiva encontrada entre

o BDNF e TBARS ajudam a suportar a hipótese de que os níveis elevados de BDNF funciona como um mecanismo de compensação para o dano oxidativo e consequente estresse metabólico, ao menos, neste grupo de pacientes cronicamente medicados.

Já em pacientes bipolares foi encontrado, durante episódio maníaco, uma correlação negativa entre BDNF e TBARS (Kapczinski et al., 2008). O resultado deste estudo e do anterior relacionado aos níveis altos de BDNF em SZ apóia a hipótese de padrões diferenciais de danos entre THB e SZ, com um processo degenerativo precoce em SZ e um padrão de deterioro episódio-dependente do THB.

Estudos recentes apontam alterações da atividade das enzimas antioxidantes (superóxido dismutase, catalase e glutationa peroxidase) nas hemácias (Kuloglu et al., 2002; Ozcan et al., 2004) e no soro (Savas et al., 2006; Frey et al., 2007) de pacientes bipolares.

Os níveis de peroxidação lipídica geralmente aparecem aumentados em pacientes bipolares (Kuloglu et al., 2002; Ozcan et al., 2004; Andreazza et al., 2007).

Existem diversas evidências mostrando o envolvimento das espécies reativas do oxigênio (ERO) em diversas patologias, especialmente nos transtornos neurológicos e psiquiátricos devido a vulnerabilidade do sistema nervoso central ao estresse oxidativo (Takuma et al., 2004).

O papel do estresse oxidativo no THB tem sido sugerido por estudos que observaram uma redução da atividade da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutationa peroxidase e aumento de malondialdeído em sangue periférico de indivíduos com THB (Ozcan et al., 2004; Ranjekar et al., 2003; Kuloglu et al., 2002).

A importância do EO na fisiopatologia do THB é apoiada pela descrição da disfunção mitocondrial e alteração do metabolismo energético neste transtorno. (Kato and Kato, 2000; Stork and Renshaw, 2005). Gens que regulam a função mitocondrial estão regulados para baixo no hipocampo e CPF de pacientes bipolares (Iwamoto et al., 2005; Macdonald, 2006). O dano mitocondrial está

associado à indução de cascatas de sinalização que levam a apoptose. (Nicholls e Budd, 2000). O BDNF previne a morte celular induzida pelo estresse do retículo endoplasmático (Shimoke et al., 2004). Sabemos que a disfunção na resposta do estresse do RE causada por mutações genéticas ou fatores ambientais pode resultar em várias doenças, tais como diabetes, doenças inflamatórias e neurodegenerativas e possivelmente THB (Yoshida, 2007).

2.6 Inflamação e Sistema Complemento

Especificamente, o sistema complemento é o principal mediador humoral do processo inflamatório junto aos anticorpos. Compõem, juntamente com algumas linhagens celulares e mecanismos de barreira, o sistema imune inato do organismo, com função importante na defesa humoral inespecífica. É constituído por um conjunto de proteínas (cascata protéica), mais de vinte proteínas circulantes, tanto solúveis no plasma como expressas na membrana celular, e pode ser ativado por diversos mecanismos. Também é contituído por um número similar de receptores da superfície celular e proteínas reguladoras. Tem sido descrita em várias células, incluindo células epiteliais e musculares, eritrócitos e diferentes tipos de leucócitos.

A deficiência de uma ou mais proteínas da cascata pode ser responsável pela suscetibilidade aumentada a várias doenças. As deficiências podem ser genéticas, de regulação ou mesmo de receptores ou adquiridas. Por outro lado, o aumento da concentração sérica das proteínas do sistema de complemento pode ocorrer em consequência a uma resposta de fase aguda (trauma, inflamação ou necrose tissular), servindo de indicativos para estas condições.

O complemento é um dos sistemas maiores da imunidade inata, e tem como função, dentre outras, reconhecer e eliminar células necróticas ou apoptóticas. As proteínas do sistema complemento se ligam a essas células, ativando a fração C3 do complemento, que inicia a ocorrência dessa cascata

O sistema complemento participa dos seguintes processos biológicos: fagocitose, opsonização, quimiotaxia de leucócitos, liberação de histamina dos

mastócitos e basófilos e de espécies ativas de oxigênio pelos leucócitos, vasoconstricção, contração da musculatura lisa, aumento da permeabilidade dos vasos, agregação plaquetária e citólise.

A ativação do sistema complemento ocorre por três vias: a clássica, a alternativa e a via da lecitina. (Figura 1).

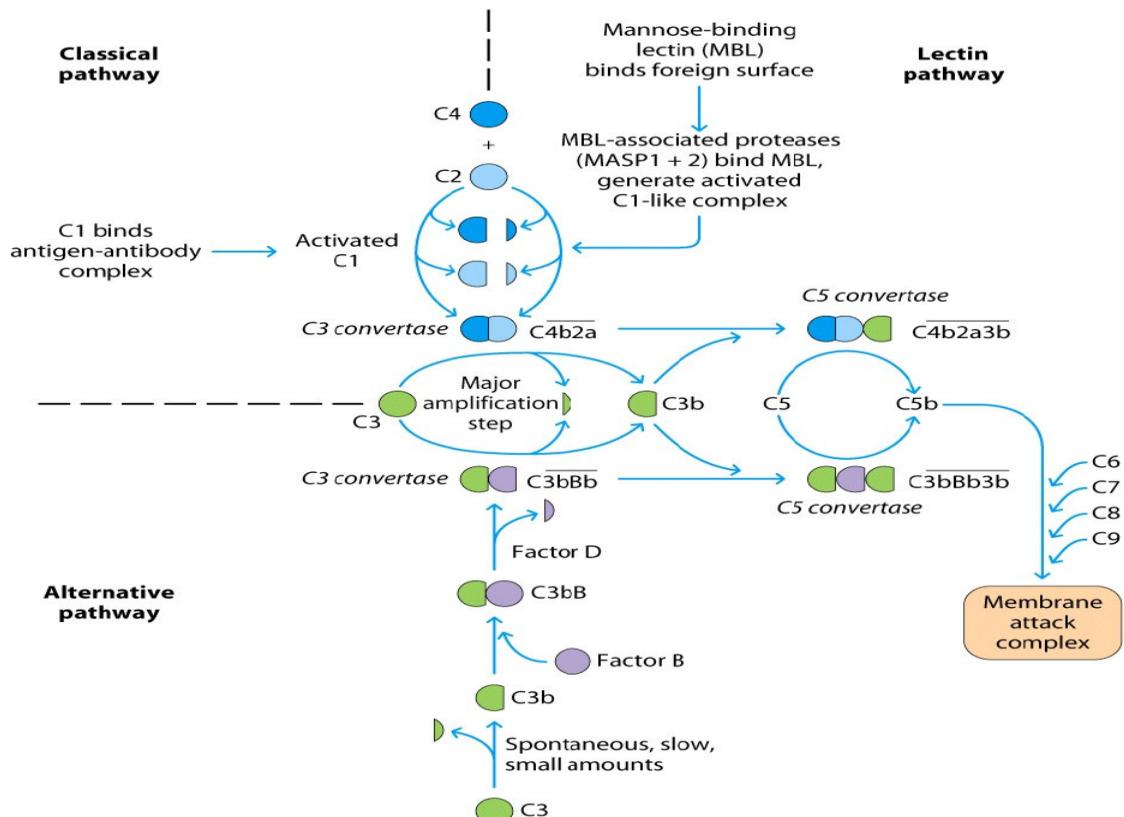


Figura 1 - As três vias de ativação do complemento (Kubi J, 2002).

Estudos têm demonstrado o envolvimento do sistema complemento na fisiopatologia da esquizofrenia bem como do transtorno de humor bipolar.

Existem indícios de que o sistema complemento está ativado em várias doenças neurodegenerativas, com evidências incipientes de que o sistema complemento está envolvido na SZ, com a ativação das vias clássicas e da manose, possivelmente contribuindo para sua etiopatogênese por neurotoxicidade e apoptose neuronal (Mayilyan et al., 2006).

Há evidências que sugerem um papel complementar da apoptose relacionada com a patogênese da SZ. Resultados promissores, implicando o

sistema complemento na neurogênese e na remodelagem das sinapses durante o desenvolvimento cerebral, sugerem um papel potencial do complemento nos processos de desenvolvimento neurológico que contribuem para susceptibilidade da SZ (Woods, 1998; Stevens et al., 2007)

Boyajyan e colaboradores (2010), demonstrou atividade significativamente elevada da proteína C3 no sangue de pacientes esquizofrênicos em comparação com indivíduos saudáveis, enquanto que a atividade da via clássica foi a mesma que em indivíduos saudáveis. A deposição de C3 ativado em células apoptóticas tem demonstrado aumentar a eficiência de sua absorção pelas células fagocíticas, ajudando fagócitos a eliminar as células apoptóticas. Propõe-se então que os níveis elevados de C3 em pacientes esquizofrênicos podem resultar da hiperativação da via alternativa do complemento a partir destas células em apoptose.

Em estudo de Hakobyan et al (2005), onde estudou pacientes esquizofrênicos de fase aguda da doença, verificou um aumento de C3 e C4 em níveis sanguíneos destes pacientes, dados estes confirmado por estudos prévios, que por sua vez, pode ser explicado pelo nível significativamente elevado da concentração sérica de IL-6 no SZ, como é conhecido que IL-6 é particularmente importante para estimular a produção de proteínas de fase aguda pelo fígado.

Em outro estudo conduzido por Mayilyan e colaboradores (2006) foi sugerido uma elevada atividade funcional da via clássica em pacientes crônicos com SZ comparados a controles saudáveis.

Os dados relacionados às concentrações de C3 e C4 no soro ou plasma de pacientes com SZ são também um tanto inconsistentes entre os diferentes estudos. Há relatos de diminuição da concentração de C3 em pacientes crônicos e aumento em livre de fármacos (Wong et al, 1996).

No entanto, grande parte dos estudos conclui alterações não significativas ou ausência de alterações. Cabe ressaltar que as medições da concentração de C3 e C4 podem ser insatisfatórias visto que também medem produtos de degradação de C3 e C4 (Maes et al, 1997).

Maes e colaboradores (1997) também mostrou alta concentração de C4 no plasma de pacientes com SZ não medicados o que não se reflete nos resultados dos outros grupos.

Em um estudo de Morera e colaboradores (2007) sobre a correlação da relação entre proteínas de fase aguda e psicopatologia na esquizofrenia paranóide, níveis séricos de C3 e C4 foram sugeridos como marcadores biológicos, para sintomas negativos da esquizofrenia paranóide. Apesar de nenhum item da escala PANSS (Positive and Negative Syndrome Scale) se correlacionar significativamente com os níveis de C3 e C4, três dos sete itens da escala mostram correlações positivas com os níveis destas proteínas. Esses itens foram, para C3, repertório pobres, retraimento social/apatia e pensamento estereotipado e para o C4, retraimento social/apatia. Além disso, dois itens da escala de psicopatologia geral também foram significativamente correlacionados com o C3 (esquiva social) e com níveis de C4 (atenção deficiente) no soro. No entanto, deve-se considerar o tamanho da amostra deste estudo que foi pequeno ($N = 15$).

O estudo de Wadee et al (2002), investigou os níveis de proteínas C3, C4, C6 e do fator B no soro de 45 pacientes em episódio de mania. Os resultados demonstram uma série de diferenças significativas entre pacientes e controles. Houve aumento das proteínas C3, C6 e do fator B no grupo de pacientes quando comparados com os controles. Nossos resultados sugerem uma relação entre a mania e parâmetros imunológicos associados com as respostas de fase aguda.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Primário

O objetivo deste estudo é verificar se indivíduos esquizofrênicos e bipolares eutímicos apresentam alterações nos níveis séricos de C3 e C4 comparando-os com controles.

3.2 Objetivos Secundários

- Verificar possíveis correlações entre variáveis clínicas e os níveis séricos de C3 e C4.
- Verificar possíveis correlações entre diferentes tratamentos e os níveis séricos de C3 e C4.

4. ARTIGO SUBMETIDO

ARTIGO SUBMETIDO À NEUROSCIENCE LETTERS

INCREASED SERUM LEVELS OF C3 AND C4 IN PATIENTS WITH SCHIZOPHRENIA COMPARED TO EUTYMIC BIPOLAR DISORDER AND HEALTHY CONTROLS

Lisiane dos Santos Sória^{a,b,c*}, Carolina de Moura Gubert^{a,b}, Keila Maria Ceresér^{a,b,d,e}, Gabriela Delevati Colpo^{a,b,c,e}, Mariana Pedrini^{b,d,f}, Gabriel Rodrigo Fries^{a,b,e,g}, Paulo Silva Belmonte-de-Abreu^{c,d,e,f}, Maurício Kunz^{a,b,d,e}, Lenise Petter Francesconi^{b,c,f}, Márcia Kauer-Sant'Anna^{a,b,d,e,g}, Clarissa Severino Gama^{a,b,d,e,f}, Flávio Kapczinski^{a,b,c,d,e},

^a Bipolar Disorder Program, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil.

^b Laboratory of Molecular Psychiatry, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

^c Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

^d Programa de Pós-Graduação em Medicina: Psiquiatria, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

^e INCT for Translational Medicine, Brazil.

^f Schizophrenia Program, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil.

^g Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

*Corresponding author at: Hospital de Clínicas De Porto Alegre - Molecular Psychiatry Laboratory - Rua Ramiro Barcelos, 2350 Prédio Anexo - Porto Alegre, RS, Brazil, CEP 90035-903.

E-mail address: lisoria@gmail.com

Phone: +55 51 33598845

FAX:+55 51 33598846

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

Dr. Flávio Kapczinski is a NARSAD Independent Investigator and is supported by the Stanley Medical Research Institute, CNPq, INCT-TM, CAPES, FIPE-HCPA. Additionally, Kapczinski is a speaker and/or advisor and/or receives research support from Lilly, AstraZeneca, Janssen, Servier, and Roche. Dra. Márcia Kauer-Sant'Anna has been an investigator in clinical trials sponsored by Servier, Canadian Institutes of Health Research and Stanley Medical Research Institute. She is also a NARSAD Young Investigator and has received unrestricted research grants from CNPq-Universal, CNPq-INCT-TM, CAPES, APA/AstraZeneca. She has received speaker fees or travel award from Lilly and Janssen. Dra. Clarissa Severino Gama has received Grant/Research Support from CNPq (PQ 305967/2008-8, 477974/2009-0), FIPE-HCPA. She has been a paid speaker for Lundbeck and Astra Zeneca. She has been a consultant for Actelion Pharmaceuticals Ltda. Dra. Keila Maria Ceresér has received research grants from CNPq-Universal, CNPq-INCT-TM and CAPES. Dr. Belmonte-de-Abreu has been an investigator in clinical trials sponsored by BMS, Janssen and Pfizer, is recipient of Research Grants from Brazilian Federal Agencies of Research (CAPES, CNPq) and received speaker fees or travel award from Novartis and Janssen in the last three years. Dr. Mauricio Kunz, Dra. Brisa S. Fernandes, Lisiâne Sória, Gabriela Colpo, Mariana Pedrini, Lenise Francesconi and Gabriel Rodrigo Fries have declared no conflict of interest.

ABSTRACT

Evidence suggests the involvement of the Complement System (CS) with the pathophysiology of Schizophrenia (SZ) and Bipolar Disorder (BD). The CS is an important part of the innate immune system, with the Complement 3 (C3) playing a central role in all the three distinct pathways. To compare levels of C3 and C4 among patients with SZ and euthymic patients with BD and healthy controls, we recruited 53 patients with SZ, 20 euthymic patients with BD and 80 healthy controls. Patients fulfilled DSM-IV diagnostic criteria and symptomatology was assessed through BPRS and CGI for patients with SZ and YMRS and HAMD for patients with BD. Serum levels of C3 and C4 were quantified through nephelometry. C3 was significantly higher in patients with SZ when compared to both controls ($p<0.011$) or euthymic BD patients. C3 levels were not different between controls and euthymic patients with BD ($p=0.998$). There was no significant difference between serum levels of C4 among the three groups ($p=0.164$). There was no correlation of anti-psychotic dose and C3 ($p=0.613$) or C4 ($p=0.668$). Our results suggest activation of the CS in SZ, indicated by the increased levels of C3. This activation probably occurs through the alternative pathway, since there was no increase in C4 levels.

Keywords: Complement System; C3 and C4; inflammation; Bipolar; Schizophrenia.

INTRODUCTION

Bipolar Disorder and Schizophrenia are severe psychiatric disorders that share many epidemiologic and clinical features. Several pathophysiological mechanisms implicated in Schizophrenia have also been shown to be involved in Bipolar Disorder. However, very few studies have focused on examining the different ways these mechanisms are involved in each disorder.

Different lines of research have examined the role of neurotrophins and oxidative stress on Bipolar Disorder and Schizophrenia. Nevertheless, the most extensively study so far seems to be the role of inflammation. In the field of mood disorders, in particular, the immune system seems to play a particularly important role. Over the years, a significant body of accumulated evidence suggests that major depression is associated with dysfunction of inflammatory mediators. Patients with unipolar depression who are otherwise clinically healthy have been shown to present activated inflammatory pathways, with increased pro-inflammatory cytokines, acute-phase proteins, and increased expression of chemokines and adhesion molecules.

More recently, evidence indicates that Bipolar Disorder and inflammation are linked through shared genetic polymorphisms and gene expression, as well as altered cytokine levels during acute episodes and euthymia. Inflammatory processes have also been implicated in the pathophysiology of SZ, and different studies have focused on the role of inflammation in SZ. Many observations of immune deregulation in SZ overlap with central pathophysiological mechanisms as well as with clinical manifestations of the illness,

So far, most of the studies of inflammation in psychiatric disorders have focused on inflammatory cytokines. The involvement of other components of the inflammatory response has remained fairly obscure. The examination of different components of the inflammatory mechanism involved in these disorders might provide new possibilities of treatment. The serum complement system is one of the most important components of humoral immunity; it consists of separate plasma proteins that react in a specific sequence with antigen-antibody complexes. The result of this sequence of reactions is increased vascular permeability, attraction of polymorphonuclear leukocytes, enhancement of phagocytosis, and alterations in cell membrane that lead to lysis and cell death [10].

Therefore, this study was designed to examine levels of two different components of the complement system, C3 and C4, on both euthymic patients with BD and chronic stabilized patients with SZ in comparison to healthy controls.

MATERIAS AND METHODS:

This case-control study protocol was approved by the local ethics committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brazil (HCPA). All subjects provided written informed consent before inclusion in the study.

We recruited fifty-three stabilized outpatients with SZ, all chronically medicated, from the HCPA Schizophrenia Program and twenty euthymic outpatients with BD from the HCPA Bipolar Disorders Program. All subjects had a comprehensive clinical interview by a trained psychiatrist. Only non-smokers and non-obese subjects were included. Obesity was defined as a body mass index (weight in kilograms/height² in meters) of 30 or more. The diagnosis of BD and SZ were confirmed according to the DSM-IV [1]. Psychiatric status in patients with SZ was assessed with the BPRS [9] and the CGI [8]. Only patients with BPRS scores ≤ 25 and no history of a psychiatric hospitalization over the last two years were included in the study. Mood symptoms in patients with BD were assessed using the YMRS [11] and the HAMD-21 [5]. Patients were considered euthymic, and therefore able to participate in the study, when both YMRS and HAMD scores were lower than seven. The control group consisted of eighty medication-free healthy volunteers who had no current or previous history as well as no first-degree family history of a major psychiatric disorder, including dementia or mental retardation, matched by age and sex.

Serum C3 and C4 measurement

Each subject had 5 ml of blood collected by venipuncture without anticoagulants, and serum was obtained by centrifugation at 3,000xg for 5 minutes and kept frozen at -70°C for up to 6 months, until the assay by nephelometry.

Statistical Analysis

Analysis was performed using SPSS Version 18.0. Demographic and clinical characteristics were analyzed using chi-square and ANOVA test as indicated. Descriptive analyses are presented as mean \pm SD or median (interquartile range) and p -values < 0.05 were considered significant. C3 levels showed a parametric distribution, C4 levels showed nonparametric distribution and were analyzed with appropriate tests as indicated in tables. Relationships between variables were assessed with Spearman rank correlation coefficient.

RESULTS

The subjects' demographics and clinical characteristics are summarized in table 1.

Insert table 1

The three groups were not significantly different for age ($p=0.115$). Length of illness was higher in the group with SZ than in the group with BD (18.0 ± 16.7 vs. 12.0 ± 16.3 , $p=0.026$). Patients with SZ were predominantly male (76%), while the BD and control groups had lower frequency of male subjects (40% for both groups). In the SZ group, 12 patients were on atypical antipsychotics, 13 on typical antipsychotics and 28 on clozapine. The BD group had 15 patients on lithium, 8 on other mood stabilizers, 10 on antipsychotics, 3 on antidepressants and 6 on benzodiazepines.

C3 was significantly increased in patients with SZ when compared to either controls ($p<0.011$) or euthymic patients with BD ($p<0.011$). C3 levels were not different in controls compared to euthymic BD patients ($p=0.998$) (figure 1).

Insert figure 1

There was no significant difference in C4 serum levels among the three groups ($p=0.164$) (figure 2). No correlation was found between dose of antipsychotic medication and levels of C3 ($p=0.613$) or C4 ($p=0.668$).

Insert figure 2

DISCUSSION

Our results are in line with those from previous reports showing increased C3 and C4 levels in Schizophrenia [4] and Bipolar Disorder [12]. However, to our knowledge, this is the first study to evaluate euthymic patients with Bipolar Disorder in comparison to Schizophrenia and healthy controls. Considering that our comparison involved patients in non-acute phases of illness (euthymic BD vs. chronic SZ), our finding provides further evidence of a chronic immune activation and inflammatory syndrome in SZ, in line with previous studies [7]. Nevertheless, these findings could also be explained by the longer duration of illness in the SZ group [3].

We believe that a comparative assessment of the pathophysiological mechanisms at play in BD and SZ may provide interesting insights into the different roles played by such mechanisms in each disorder. Past comparisons have suggested that different profiles of oxidative stress [6], neurotrophins [2] and different patterns of correlation between oxidative stress markers and neurotrophins are at play in SZ and BD. While different lines of evidence suggest that, in BD, we can see an episode-related deterioration pattern, it appears that, in SZ, this deterioration pattern seems to be of a chronic nature, starting at the onset of the illness.

However, the interpretation of this report must take in consideration its limitations. Potential confounders such as diet and physical activity have not been taken into consideration. Also, use of antipsychotic medications has been previously shown to be associated with higher levels of C3 in patients with SZ [4]. We were

unable to consider different medications in our analysis, therefore, interference cannot be ruled out.

REFERENCES

- [1] American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, fourth Edition. Washington, DC, 1994.
- [2] C.S. Gama, A.C. Andreazza, M. Kunz, M. Berk, P.S. Belmonte-de-Abreu, F. Kapczinski. Serum levels of brain-derived neurotrophic factor in patients with schizophrenia and bipolar disorder, *Neurosci Lett.* 420 (2007) 45-48.
- [3] R. Ganguli, Z. Yang, G. Shurin, K.N. Chengappa, J.S. Brar, A.V. Gubbi, B.S. Rabin. Serum interleukin-6 concentration in schizophrenia: elevation associated with duration of illness, *Psychiatry Res.* 51 (1994) 1-10.
- [4] S. Hakobyan, A. Boyajyan, R.B. Sim. Classical pathway complement activity in schizophrenia, *Neurosci Lett.* 374 (2005) 35-37.
- [5] M. Hamilton. A rating scale for depression, *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry.* 23 (1960) 56-62.
- [6] M. Kunz, C.S. Gama, A.C. Andreazza, M. Salvador, K.M. Cereser, F.A. Gomes, P.S. Belmonte-de-Abreu, M. Berk, F. Kapczinski. Elevated serum superoxide dismutase and thiobarbituric acid reactive substances in different phases of bipolar disorder and in schizophrenia, *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 32 (2008) 1677-1681.
- [7] M. Kunz, K. M. Cereser, P.D. Goi, G. R. Fries, A.L. Teixeira, B. Fernandes, P. Belmonte-de-Abreu, M. Kauer-Sant'Anna, F. Kapczinski, C.S. Gama. Serum levels of il-6, il-10 and tnf-alpha; in patients with bipolar disorder and with schizophrenia: differences in pro and antiinflammatory balance, *Revista Brasileira de Psiquiatria.* (2011).
- [8] M.S. Lima, B.G.O. Soares, G. Paoliello, R.M. Vieira, C.M. Martins, J.I.M. Neto, Y. Ferrão, D.A. Schirmer, F.M. Volpe. The Portuguese version of the Clinical Global Impression – Schizophrenia Scale: validation study, *Rev Bras Psiquiatr.* 29 (2007) 246-249.
- [9] F. Romano & H. Elkis. -Tradução e Adaptação de um Instrumento de Avaliação Psicopatológica das Psicoses: a Escala Breve de Avaliação Psiquiátrica. Versão Ancorada (BPRS-A), *Jornal Brasileiro de Psiquiatria* 45 (1996) 43-49.
- [10] B. Spivak, M. Radwan, D. Elimelech, Y. Baruch, G. Avidan, S. Tyano. A study of the complement system in psychiatric patients, *Biol Psychiatry.* 6 (1989) 640-642.
- [11] R.C. Young, J.T. Biggs, V.E. Ziegler, D.A. Meyer. A rating scale for mania: reliability, validity and sensitivity, *The British Journal of Psychiatry: The Journal of Mental Science* 133 (1978) 429-435.
- [12] A.A. Wadee, R.H. Kuschke, L.A. Wood, M. Berk, L. Ichim, M. Maes. Serological observations in patients suffering from acute manic episodes, *Hum Psychopharmacol.* 4 (2002) 175-179.

Table 1
Characteristics of healthy controls and patients with Bipolar Disorder (BD) and, Schizophrenia (SZ).

	Control group (n=80)	BD euthymic (n=20)	SZ (n=53)	p-value
Gender (M/F) ^a	32/48	8/12	40/13	<0.0001*
Age, years ^a	40.7 (12.5)	46.6 (12.6)	39.9 (9.4)	0.115**
Years of illness ^b	-	12.0(16.3)	18.0(16.7)	0.026***
YMRS score ^b	-	1.5 (6.5)	-	-
HAMD score ^b	-	4.0 (4.5)	-	-
BPRS score ^b	-	-	12.0 (11.0)	-
CGI score ^b	-	-	2.0 (1.0)	-
Antipsychotic daily dose, In mg of chlorpromazine equivalents ^a	-	-	501.9 (218.1)	-
C3(mg/dL)	162.6(50.1)	163.4(32.8)	190.3(43.6)	0.003**
C4 (mg/dL)	38.4 (24.9)	33.1 (10.6)	40.3 (16.1)	0.352**

YMRS, Young Mania Rating Scale; HAMD, Hamilton Depression Rating Scale; BPRS, Brief Psychiatry Rating Scale; CGI, clinical global impression.

*Chi-Square

**One-way ANOVA

*** Mann-Whitney

^aShown as mean ± standard deviation
control/euthymic vs. SZ, $p<0.011$ (Tukey)

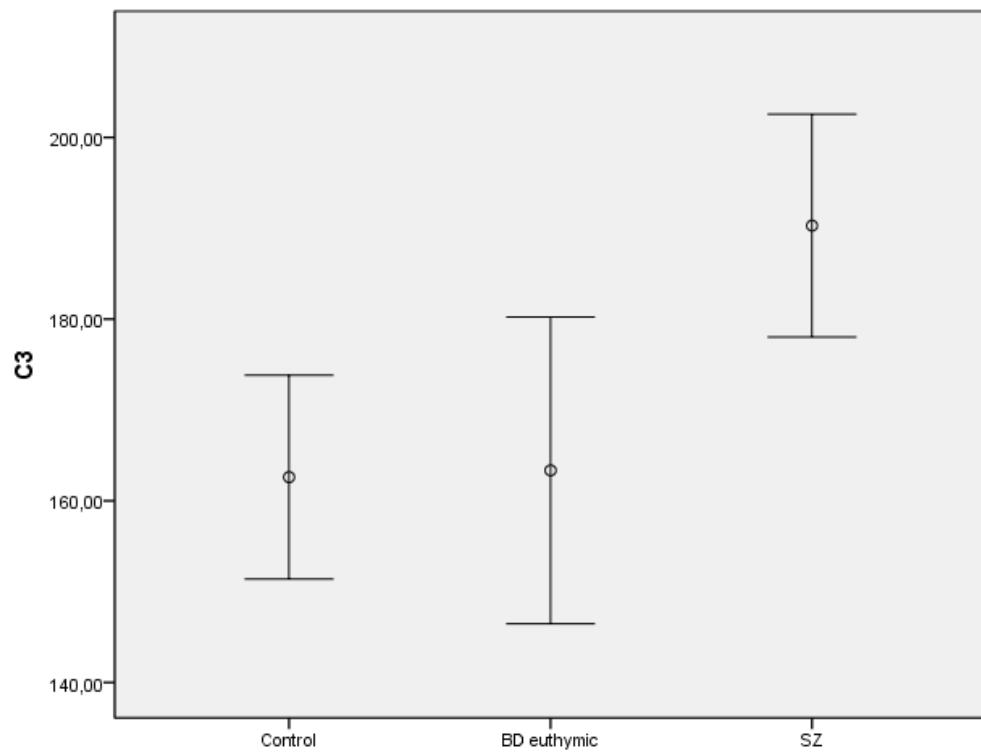


Figure 1: Comparison of serum C3 mean levels. Error bars represent standard deviation. C3 was significantly increased in patients with SZ when compared to either controls ($p<0.011$) or euthymic patients with BD ($p<0.011$). C3 levels were not different in controls compared to euthymic BD patients ($p=0.998$).

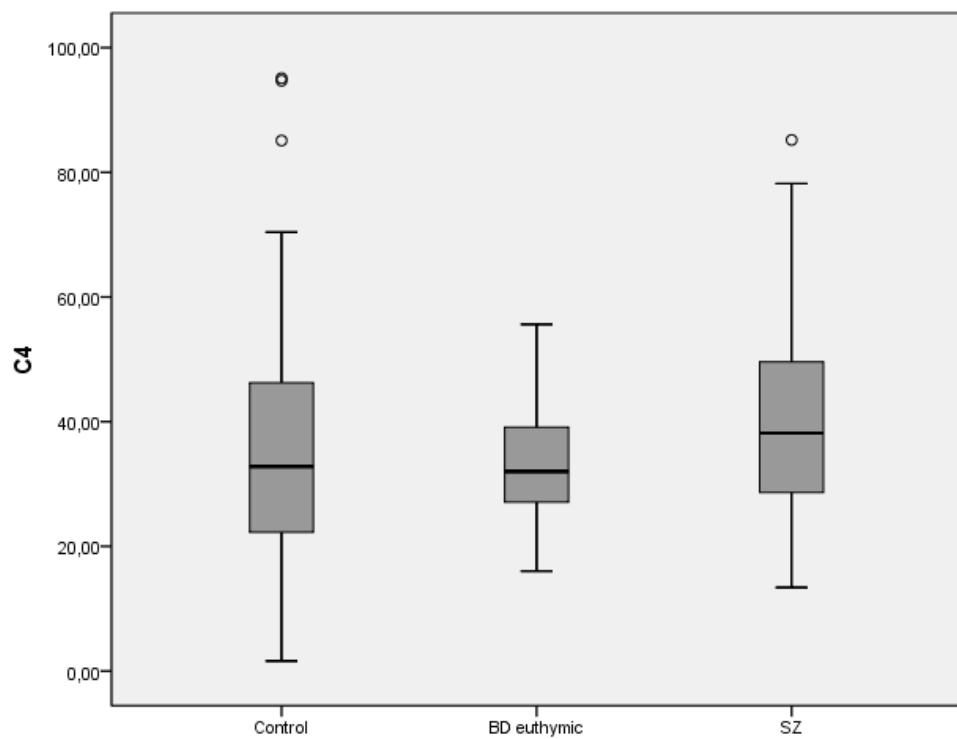


Figure 2: Comparison of C4 levels. Box-plot of serum C4 levels in patients with SZ, euthymic BD, and controls. There was no significant difference in C4 serum levels among the three groups ($p=0.164$).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O envolvimento do processo inflamatório com a consolidação de biomarcadores, que sugerem a inflamação como um mecanismo implicado na fisiopatologia da esquizofrenia, bem como do transtorno bipolar, está bem relatado e consolidado por vários estudos prévios.

Nossos resultados estão de acordo com estudos anteriores que demonstraram um aumento nos níveis de C3 e C4 na esquizofrenia e transtorno bipolar embora alguns estudos tenham relatado o inverso.

A nossa descoberta fornece evidência adicional de uma ativação imunológica crônica e síndrome inflamatória na SZ. No entanto, acreditamos que padrões diferenciais nos mecanismos fisiopatológicos ocorrem entre as duas doenças, evidenciado por diferentes padrões de correlação entre marcadores de estresse oxidativo e neurotrofinas, enquanto linhas de evidência sugerem para SZ um padrão de deterioração de natureza crônica já a partir do início da doença no transtorno de humor bipolar o padrão de deterioração parece estar relacionado ao episódio da doença.

Nossos resultados sugerem, a partir, do aumento nos níveis de C3 na amostra de pacientes esquizofrênicos a ativação do sistema complemento nesta doença. Tal ativação provavelmente está ocorrendo pela via alternativa, uma vez que não houve aumento significativo nos níveis de C4, corroborando desta forma, com dados da literatura.

Enfim, a interpretação do presente estudo merece ressalvas quanto às suas limitações. Potenciais fatores de confusão como dieta e atividade física não foram levados em consideração. Além disso, a associação entre o uso de antipsicóticos e os níveis mais elevados de C3 em pacientes com SZ tem sido mostrado previamente. Não foi possível considerar diferentes medicações em nossa análise, portanto, a interferência não pode ser descartada.

Acreditamos que mais estudos são necessários para consolidar o papel do sistema complemento na fisiopatologia de ambas as doenças, principalmente do transtorno de humor bipolar pela escassez de estudos relacionados ao tema.

6 REFERÊNCIAS

1. Almeida Filho N, Mari JJ, Coutinho E, et al. Brazilian Multicentric Study of Psychiatry Morbidity. Methodological Features and Prevalence Estimates. *British Journal of Psychiatry*. 1997, 171:524-529.
2. American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, fourth Edition. Washington, DC, 1994.
3. Andreazza AC, Cassini C, Rosa AR, Leite MC, Almeida LM, Nardin PC, et al. Serum S100B and antioxidant enzymes in bipolar patients. *J Psychiatr Res*. 2007; 41(6):523-9.
4. Andreazza AC, Kauer-Sant'Anna M, Frey BN, Bond DJ, Kapczinski F, Young LT, Yathan LN. Oxidative stress markers in bipolar disorder: a meta-analysis. *J. Affect Disord*. 2008; 111(2-3):135-44.
5. Angst J, Sellaro R. Historical perspectives and natural history of bipolar disorder. *Biol Psychiatry*. 2000, 48(6):445-57.
6. Arolt V, Rothermundt M, Wandinger KP, Kirchner H. Decreased in vitro production of interferon-gamma and interleukin-2 in whole blood of patients with schizophrenia during treatment. *Mol Psychiatry*. 2000, 5(2):150-158.
7. Barak, V., Barak, Y., Levine, J., Nisman, B., Roisman, I. Changes in interleukin-1 beta and soluble interleukin-2 receptor levels in CSF and serum of schizophrenic patients. *J. Basic. Clin. Physiol. Pharmacol.* 1995, (6):61-69.
8. Belmaker F. M. Medical progress: bipolar disorder. *New England Journal of Medicine* 2004, (351):476-486.
9. Berger GE, Wood S, McGorry PD. Incipient neurovulnerability and neuroprotection in early psychosis. *Psychopharmacol. Bull.* 2003, (37): 79-101.
10. Bessler H, Levental Z, Karp L, Modai I, Djaldetti M, Weizman A. Cytokine production in drug-free and neuroleptic-treated schizophrenic patients. *Biol Psychiatry*. 1995, 38(5):297-302.
11. Bostancı MO, Bagirici F, Canan S. A calcium channel blocker flunarizine attenuates the neurotoxic effects of iron. *Cell Biology and Toxicology* 2006, 22(2): 119-25.

12. Bouras C, Kovari E, Hof PR, Riederer BM, Giannakopoulos P. Anterior cingulate cortex pathology in schizophrenia and bipolar disorder. *Acta Neuropathologica* 2001, (102):373-379.
13. Boyajyan A, Khoyetsyan A, Chavushyan A. Primary Title: Alternative complement pathway in schizophrenia. *Neurochemical Research*. 2010 Vol. 35, (6): 894-898,
14. Brebner K, Hayley S, Zacharko R, Merali Z, Anisman H. Synergistic effects of interleukin-1beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha: central monoamine, corticosterone, and behavioral variations. *Neuropsychopharmacology* 2000, 22(6):566-80.
15. Castrén E. Is mood chemistry? *Nature Reviews Neuroscience* 2005, (6):241-246.
16. Coskun S, Gönül B, Güzel NA, Balabanlı B. The effects of vitamin C supplementation on oxidative stress and antioxidant content in the brains of chronically exercised rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2005, 280 (1-2): 135-8.
17. Coyle JT, Duman RS. Finding the intracellular signaling pathways affected by mood disorder treatments. *Neuron* 2003, (38):157-160.
18. Craddock N, Jones I. Genetics of bipolar disorder. *Journal of Medical Genetics* 1999, (36):585-594.
19. Craddock N, O'Donovan MC, Owen MJ. The genetics of schizophrenia and bipolar disorder: dissecting psychosis. *Journal of Medical Genetics* 2005, 42:193-204.
20. Cunha AB, Frey BN, Andreatta AC, Goi JD, Rosa AR, Gonçalves CA, et al. Serum brain-derived neurotrophic factor is decreased in bipolar disorder during depressive and manic episodes. *Neurosci Lett*. 2006 [acessado em 11 dez 2010];398(3):215-219.
21. Cunningham ET Jr, Wada E, Carter DB, Tracey DE, Battey JF, De Souza EB. In situ histochemical localization of type I interleukin-1 receptor messenger RNA in the central nervous system, pituitary, and adrenal gland of the mouse. *J Neurosci*. 1992;12(3):1101-1114.

22. Davis BD. Frontiers of the biological sciences. *Science* 1980, 209:78-89.
23. De Simoni, M.G., Imeri, L., Cytokine-neurotransmitter interactions in the brain. *Biol. SAignals Recept.* 1998, 7, 33-44.
24. Depp, C.A., Davis, C.E., Mittal, D., Patterson, T.L., Jeste, D.V. Health-related quality of life and functioning of middle-aged and elderly adults with bipolar disorder. *J. Clin. Psychiatry* 2006, 67, 215–221.
25. Ebrinç S, Top C, Oncül O, Başoğlu C, Cavuşlu S, Cetin M. Serum interleukin 1 alpha and interleukin 2 levels in patients with schizophrenia. *J Int Med Res.* 2002, 30(3):314-317.
26. Einat H, Yuan TD, Li J, Du J, Manji HK, Chen G. 2003. The role of the extracellular signal-regulated kinase significant phatway in nood regulation. *The Journal of Neuroscience*, August 13, 2003, 23(19):7311-7316.
27. Frangou S, Donaldson S, Hadjulis M, Landau S, Goldstein LH. The Maudsley Bipolar Disorder Project: executive dysfunction in bipolar disorder I and its clinical correlates. *Biol Psychiatry*. 2005, 58(11):859-864.
28. Frey BN, Andeazza AC, Ceresér KM, Martins MR, Valvassori SS, Reus GZ, et al. Effects of mood stabilizers on hippocampus BDNF levels in na aniumal model of mania. *Life Sci.* 2006, 79:(3)381-386.
29. Frey BN, Andreazza AC, Kunz M, Gomes FA, Quevedo J, Salvador M, et al. Increased oxidative stress and DNA damage in bipolar disorder: a twin-case report. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2007, 31(1):283-285.
30. Fukomoto T, Morinobu S, Okamoto Y, Kagaya A, Yamawaki S. Chronic lithium treatment increase the expression of brain neurotrophic factor in the rat brain. *Psychopharmacology (Berl)* 2001, 158:100-106.
31. Gama CS, Berk M, Andreazza AC, Kapczinski F, Belmonte-de-Abreu P. Serum levels of brain-derived neurotrophic factor and thiobarbituric acid reactive substances in chronically medicated schizophrenic patients: a positive correlation. *Rev Bras Psiquiatr.* 2008, 30(4):337-340.
32. Gama CS, Andreazza AC, Kunz M, Berk M, Belmonte-de-Abreu PS, Kapczinski F. Serum levels of brain-derived-neurotrophic factor in patients with schizophrenia and bipolar disorder. *Neurosci Lett* 2007, 420(1): 45-48.

33. Gama CS, Salvador M, Andreazza AC, Kapczinski F, Silva Belmonte-de-Abreu p. elevated serum superoxide dismutase and thiobarbituric acid reactive substances in schizophrenia: a study of patients treated with haloperidol or clozapine. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2006, 30(3):512-515.
34. Gama CS, Salvador M, Andreazza AC, Lobato MI, Berk M, Kapczinski F, Belmonte-de-Abreu PS. Elevated serum thiobarbituric acid reactive substances in clinically symptomatic schizophrenic males. *Neurosci Lett* 2008, 433:270-273.
35. Ganguli, R., Yang, Z., Shurin, G., Chengappa, K.N., Brar, J.S., Gubbi, A.V., Rabin, B.S., Serum interleukin-6 concentration in schizophrenia:elevation associated with duration of illness. *Osychiatry Res.* 1994, 51, 1-10.
36. Gilgun-Sherki Y, Rosenbaum Z, Melamed E, Offen D. Antioxidant therapy in acute central nervous system injury: current state. *Pharmacological Reviews*, 2002, 54(2):271-284.
37. Goncharova LB, Tarakanov AO. Molecular networks of brain and immunity. Brain immunity. *Brain Res Rev*. 2007 Aug;55(1):155-66.
38. Grant BF, Stinson FS, Hasin DS, Dawson DA, Chou SP, Ruan WJ, Huang B. Prevalence, correlates, and comorbidity of bipolar I disorder and axis I and II disorder: results from the National Epidemiologic Survey on alcohol and related conditions. *Journal of Clinical Psychiatry* 2005, 66:1205-1215.
39. Gratacos M, Gonzalez JR, Mercader JM, Cid RD, Erretavizcaya M, Estivill X. Brain-derived neurotrophic factor val66met and psychiatric disorders: meta-analysis of case-control studies confirm association to substance -related disorders, eating disorders, and schizophrenia. *Biol Psychiatry* 2007, 61(6): 911-922.
40. Hakobyan S, Boyajyan A, Sim RB. Classical pathway complement activity in schizophrenia. *Neurosci Lett* 2005, 374(1):35-37.
41. Haring C, Fleischhacker WW, Schett P, Humpel C, Barnas C, Saria A. Influence of patient-related variables on clozapine plasma levels. *Am J Psychiatry* 1990, 147:1471-1475.

42. Henneberg AE, Horter S, Ruffert S. Increased prevalence of antibrain antibodies in the sera from schizophrenic patients. *Schizophr. Res.* 1994; 14:15-22.
43. 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. *Human Molecular Genetics* 2005, 14(2) :241-53.
44. Jarskog LF, Glantz LA, Gilmore JH, Lieberman JA. Apoptotic mechanisms in the pathophysiology of schizophrenia. *Prog. Neuro-psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 2005, 29:846-858.
45. Judd LL, Akiskal HS, Schettler PJ, Endicott J, Maser J, Solomon DA, Leon AC, Rice JA, Keller MB. 2002. The long-term natural history of the weekly symptomatic status of bipolar I disorder. *Archives of General Psychiatry* 2002, 59:530-537.
46. Kalinichenko SG, Matveeva NY. Morphological characteristics of apoptosis and its significance in neurogenesis. *Neurosci Behav Physiol.* 2008, 38(4):333-344.
47. Kamińska T, Wysocka A, Marmurowska-Michałowska H, Dubas-Slemp H, Kandefer-Szczęsnia M. Investigation of serum cytokine levels and cytokine production in whole blood cultures of paranoid schizophrenic patients. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2001, 49(6):439-445.
48. Kapczinski F, Frey BN, Andreazza AC, Kauer-Sant'Anna M, Cunha ABM, Post RM. Increased oxidative stress as a mechanism for decreased BDNF levels in acute manic episodes. *Rev Bras Psiquiatr.* 2008;30(3):243-5.
49. Kapczinski F, Frey BN, Kauer-Sant'Anna M, Grassi-Oliveira R, Berk M. 2008. Brain-derived neurotrophic factor and neuroplasticity in bipolar disorder. *Expert Ver Neurother* 2008, 8:1101-1113.
50. Kato T, Kato N. 2000. Mitochondrial dysfunction in bipolar disorder. *Bipolar disorders*, 2000, 2(3 Pt 1):180-190.
51. Kelsoe JR. 2003. Arguments for the genetic basis of the bipolar spectrum. *Journal of affective Disorders*, 73(1-2): 183-97.

52. Kim YK, Jung HG, Myint AM, Kim H, Park SH. Imbalance between proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in bipolar disorder. *J Affect Disord.* 2007, 104(1-3):91-95.
53. Kim YK, Myint AM, Lee BH, Han CS, Lee SW, Leonard BE, T-helper types 1, 2, and 3 cytokine interactions in patients. *Psychiatry Res.* 2004, 129(3):267-272.
54. Kim YK, Kim L, Lee MS. Relationships between interleukins, neurotransmitters and psychopathology in drug-free male schizophrenics. *Schizophr. RES.* 2000, 44, 165-175.
55. Kraepelin M. Introdução à psiquiatria clínica. Terceira lição: demência precoce. *Revista Latinoamericana de Psicopatologia Fundamental*, 2001, São Paulo, v. 4, n. 4, p. 130-137. Disponível em: <<http://www.fundamentalpsychopathology.org/art/dez1/classicos.kraepelin.pdf>>. Acesso em: 10 nov. 2010.
56. Kubi J, Imunologia, 4th ed. New York, W.H.Freeman and Comapny, 2002. NÃO CITADA
57. Kuloglu M, Ustundag B, Atmaca M, Canatan H, Tezcan AE, Cinkilinc N. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme levels in patients with schizophrenia and bipolar disorder. *Cell Biochemistry and Function*, 2002, 20:171-175.
58. Kuloglu M, Ustundag B, Atmaca M, Canatan H, Tezcan AE, Cinkilinc N. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme levels in patients with schizophrenia and bipolar disorder. *Cell Biochem Function*. 2002, 20:171-175.
59. Leeuwenburgh C, Heinecke JW. Oxidative stress and antioxidants in exercise. Current. *Medicinal Chemistry*, 2001, 8(7):829-38.
60. Leverich GS, Post RM. Course of bipolar illness after history of childhood trauma. *Lancet*, 2006, 367(9516), 1040-1042.
61. Lopez AD, Murray CJL. The global burden of disease. 1990-2020. *Nuture Medcine* 1998, 4:1241-1243.
62. MacDonald ML, Naydenov A, Chu M, Matzilevich D, Konradi C. Decrease in creatine kinase messenger RNA expression in the hippocampus and dorso-

- lateral prefrontal cortex in bipolar disorder. *Bipolar disorders*, 2006, 8(3):255-264.
63. Maes M, Bocchio Chiavetto L, Bignotti S, Battisa Tura G, Pioli R, Boin F, Kenis G, Bosmans E, de Jongh R, Lin A, Racagni G, Altamura CA. Effects of atypical antipsychotics on the inflammatory response system in schizophrenic patients resistant to treatment with typical neuroleptics. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2000, 10(2):119-124.
64. Maes M, Delange J, Ranjan R, Meltzer AY, Desnyder R, Cooremans W, Scharpé S. Acute phase proteins in schizophrenia mania and major depression: Modulation by psychotropic drugs. *Psychiatry Res*. 1997, 66(1):1-11.
65. Malhi GS, Lagopoulos J, Owen AM, Yatham LN. Bipolaroids: functional imaging in bipolar disorder. *Acta Psychiatrica Scandinavica* 2004, 110 (Suppl.422):46-54.
66. Manji HK, Drevets WC, Charney DS. The cellular neurobiology of depression. *Nature medicine* 2001, 7: 541-547.
67. Marder SR, J Mintz, Van Putten T, M Lebell, WC Wirshing, K Johnston-Cronk. Early prediction of relapse in schizophrenia: an application of receiver operating characteristic (ROC) methods. *Psychopharmacol Bull* 1991, 27:79-82.
68. Marques AH, Cizza G, Sternberg E. Brain-immune interactions and implications in psychiatric disorders. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, 2007, 29 Suppl 1:S27-32.
69. Martinez-Aran A, Vieta E, Torrent C, Sanchez-Moreno J, Goikolea JM, Salamero M, Malhi GS, Gonzalez-Pinto A, Daban C, Alvarez-Grandi S, Fountoulakis K, Kaprinis G, Tabares-Seisdedos R, Ayuso-Mateos JL. Functional outcome in bipolar disorder: the role of clinical and cognitive factors. *Bipolar Disord*. 2007, 9(1-2):103-113.
70. Masek, K., Slansky, J., Petrovicky, P., Hadden, J.W., 2003. Neuroendocrine immune interactions in health and disease. *Int. Immunopharmacol*. 2003, 3, 1235-1246.

71. Mayilyan K, Arnold JN, Presanis JS, Soghoyan AF, Sim RB. Increased complement classical and mannan-binding lectin pathway activities in schizophrenia. *Neuroscience Letters* 2006, 404:336-341.
72. Mayilyan K, Poghosyan AG. Anti brain-specific proteins and dopamine-monooxygenase autoantibodies in the blood of schizophrenic patients as well as healthy subjects with positive history of mentioned disease. *Collection of Articles of the Young Researchers* (Armenian NAS) 2001, 2:108-110).
73. Middle F, Jones I, Robertson E, Lendon C, Craddock N. Tumour necrosis factor alpha and bipolar affective puerperal psychosis. *Psychiatr Genet*. 2000, 10(4):195-198.
74. Morera AL, Henry M, García-Hernández A, Fernández-López L. Acute phase proteins as biological markers of negative psychopathology in paranoid schizophrenia. *Actas Esp Psiquiatr*. 2007, 35(4):249-252.
75. Müller-Oerlinghausen B, Berhofer A, Bauer M. Bipolar disorder. *Lancet* 2002, 359:241-247.
76. Nestler EJ, Barrot M, DiLeone RJ, Eisch AJ, Gold SJ, Monteggia LM. Neurobiology of depression. *Neuron* 2002, 34:13-25.
77. Nibuya M, Morinobu S, Duman RS. Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments. *Journal of Neuroscience* 1995, 15:7539-7547.
78. Nibuya M, Nestler EJ, Duman RS. Chronic antidepressant administration increases the expression of cAMP response element binding protein (CREB) in rat hippocampus. *Journal of Neuroscience* 1996, 16:2362-2372.
79. Nicholls DG, Budd SL. Mitochondrial and neuronal survival. *Physiol Rev*. 2000, 80:315-360.
80. O' Brien S, Sclully P, Scott L, Dinan Y. Cytokine profile in bipolar affective disorder: Focus on acutely ill patients. *J Affect Disord*. 2006, 90(2):263-267.
81. Öngur D, Drevets WC, Price JL. Glial reduction in the subgenual prefrontal cortex in mood disorders. *Proceedings of National Academy of Sciences USA* 1998, 27:13290-13295.

82. Otero GC, Merrill JE. Cytokine receptors on glial cells. *Glia*. 1994, 11(2):117-
83. Ozcan ME, Gulec M, Ozerol E, Polat R, Akyol O. Antioxidant enzyme activities and oxidative stress in affective disorders. *International Clinical Psychopharmacology*, 2004, 19:89-95.
84. Papiol S, Rosa A, Gutiérrez B, Martín B, Salgado P, Catalán R, Arias B, Fañanás L. Interleukin-1 cluster is associated with genetic risk for schizophrenia and bipolar disorder. *J Med Genet*. 2004, 41(3):219-223.
85. Parikh V, Khan MM, Mahadik SP. Differencitil effects of antipsychotcs on expression of antioxidant enzymes and membrane lipid peroxidation in rat brain. *J. Psychiatr. Res.* 37(2003)43-51.
86. Pasic J, Levy W, Sullivan M. Cytokines in depression and heart failure. *Psychosomatic Med*. 2003, 65(2):181-193.
87. Pearlson GD. Structural and functional brain changes in bipolar disorder: a selective review. *Schizophr Res*. 1999, 39:133-140.
88. Perlis RH, Ostacher MJ, Patel JK, Marangell LB, Zhang H, Wisniewski SR, Ketter TA, Miklowitz DJ, Otto NW, Gyulai L, Reilly-Harrington NA, Sachs GS, Thase ME. Predictors of recurrence in bipolar disorder: primary outcomes from the systematic treatment enhancement program for bipolar disorder (STEP-BD). *American Journal of Psychiatry* 2006, 163:217-224.
89. Pollmächer, T., Hinze-Selch, D., Mullington, J. Effects of clozapine on plasma cytokine and soluble cytokine receptor levels. *J. Clin. Psychopharmacol*. 1996, 16, 403-409.
90. Post RM, Denikoff KD, Leverich GS, Altshuler LL, Frye MA, Suppes TM, Rush AJ, Keck PE Jr, McElroy SL, Luckenbaugh DA, Pollio C, Kupka R, Nolen WA. Morbidity in 258 bipolar outpatients followed for 1 year with daily prospective ratings on the NIMH life chart method. *Journal of Clinical Psychiatry* 2003, 64:680-690.
91. Potter ED, Ling ZD, Carvey PM. Cytokine-induced conversion of mesencephalic-derived progenitor cells into dopamine neurons. *Cell Tissue Res* 1999, 296:235-246.

92. Potvin S, Stip E, Sepehry AA, Gendron A, Bah R, Kouassi E. Inflammatory cytokine alterations in schizophrenia: a systematic quantitative review. *Biol Psychiatry*. 2008; 15;63(8):801-808.
93. Potvin, S., Stip, E., Sepehry, A.A., Gendron, A., Bah, R., Kouassi, E., Inflammatory cytokine alterations in schizophrenia: a systematic quantitative review. *Biol Psychiatry* 2008; 63(8):801-8.
94. Radewicz K, Garey LJ, Genteman SM, Reynolds R. Increase in HLA-DR immunoreactive microglia in frontal and temporal cortex of chronic schizophrenics. *J. Neuropathol Exp. Neurol.* 2000; 59:137-150.
95. Raison CL, Miller AH. Brain-immune system interaction: Relevance to the pathophysiology and treatment of neuropsychiatric disorders. In: Schatzberg AF, Nemeroff CB, editors. *The American Psychiatric Publishing Textbook of Psychopharmacology*, 3rd ed. Washington DC: American Psychiatric Press, 2004, 147–162.
96. Rajkowska G, Halaris A, Selemon LD. Reductions in neuronal and glial density characterize the dorsolateral prefrontal cortex in bipolar disorder. *Biological Psychiatry* 2001; 49:741-752.
97. Ranjekar PK, Hinge A, Hegde MV, Ghate M, Kale A, Sitasawad S, Wagh UV, Debsikdar VB, Mahadik SP. Decreased antioxidant enzymes and membrane essential polyunsaturated fatty acids in schizophrenic and bipolar mood disorder patients *Psychiatry Research*, 2003, 121:109-122.
98. Rapaport MH, Manji HK. The effects of lithium on ex vivo cytokine production. *Biol Psychiatry*. 2001; 1;50(3):217-224.
99. Rattiner LM, Davis M, Ressler KJ, Brain-derived neurotrophic factor in amygdale dependent learning. *Neuroscientist*. 2005; 11(4):323-333.
100. Reddy RD, Yao JK. Free radical pathology in schizophrenia: a review. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 1996; 55(1-2):33-43.
101. Rothermundt M, Arolt V, Bayer TA. Review of immunological and immuno-pathological findings in schizophrenia, *Brain Behav. Immun.* 2001; 15:319-339.

102. Rothwell NJ, Hopkins SJ. Cytokines and the nervous system II: Actions and mechanisms of action. *Trends Neurosci.* 1995, 18(3):130-136.
103. Savas HA, Gergerlioglu HS, Armutcu F, Herken H, Yilmaz HR, Kocoglu E, et al. Elevated serum nitric oxide and superoxide dismutase in euthymic bipolar patients: impact of past episodes. *World J Biol Psychiatry.* 2006, 7(1):51-55.
104. Savino W, Dardenne M. Neuroendocrine control of thymus physiology. *Endocr Rev.* 2000, 21(4):412-443.
105. Sawada, M, Itoh, Y, Suzumura, A, Marunouchi, T, Expression of cytokine receptors in cultured neuronal and glials cells. *Neurosci. Lett.* 1993, 160, 131-134.
106. Scarpa M, Rigo A, Viglino P, Bracco F, Battistin L. Age dependence of the level of the enzymes involved in the protection against active oxygen species in the rat brain. *Proceedings of the Society for the Experimental Biology and Medicine,* 1987, 185(2):129-33.
107. Schuld A, Hinze-Selch D, Pollmächer T. Cytokine network in patients with schizophrenia and its significance for the pathophysiology of the illness. *Nervenarzt* 2004, 75, 215-226.
108. Shaltiel G, Chen G, Manji HK. Neurotrophic signaling in the Pathophysiology and treatment of bipolar disorder. *Current opinion in Pharmacology* 2006, 7(1):22-26.
109. Shimizu E, Hashimoto K, Okamura N, Koike K, Komatsu N, Kumakiri C, et al. Alterations of serum levels of brain-derived nerotrophic factor (BDNF) in depressed patiens whit or without antidepressants. *Boil. Pasychiatru.* 2003, 54(1):70-75.
110. Shimoke K, Utsumi T, Kishi S, Nishimura M, Sasaya H, Kudo M, Ikeuchi T. Prevention of endoplasmic reticulum stress-induced cell death by brain-derived neurotrophic factor in cultured cerebral cortical neurons. *Brain Research,* 2004, 1028 (1) 105-111.

111. Shintani F, Kanba S, Maruo N, Nakaki T, Nibuya M, Suzuki E, Kinoshita N, Yagi G. Serum interleukin-6 in schizophrenic patients. *Life Sci.* 1991, 49(9):661-664.
112. Stevens B, Allen NJ, Vasquez LE et al. The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination. *Cell* 2007, 131(6):1164-1178.
113. Stork C, Renshaw PF. Mitochondrial dysfunction in bipolar disorder: evidence from magnetic resonance spectroscopy research. *Molecular psychiatry*, 2005, 10(10):900-919.
114. Strakowski SM, DelBello MP, Adler CM. 2005. The functional neuroanatomy of bipolar disorder: a review of neuroimaging findings. *Molecular Psychiatry* 10:105-116.
115. Szelenyi, J. Cytokines and the central nervous system. *Brain. Res. Bull.* 2001, 54:329-338.
116. Takuma K, Baba A, Matsuda T. Astrocyte Apoptosis: implications for neuroprotection. *Progress In Neurobiology*, 2004, 72(2):111-127.
117. Tohen M. & Angst J. Epidemiology of bipolar disorder. In *Textbook in Psychiatric Epidemiology*, 2002, 2nd ed. (ed. M.T. Tsuang and M. Tohen), pp. 427-444. John Wiley & Sons: New York.
118. Toyooka K, Watanabe Y, Iritani S, Shimizu E, Iyo M, Nakamura R, Asama, K, Makifuchi, T, Kakita, A., Takahashi H, Someya T., Nawa, H. A decrease in interleukin-1 receptor antagonist expression in the prefrontal cortex of schizophrenic patients. *Neurosci. Res.* 2003, 46, 299-307.
119. Vargas HE, Gama CS, Andreazza AC, Medeiros D, Stertz L, Fries G, Palha J, Cereser KM, Berk M, Kapczinski F, Belmonte-de-Abreu PS. Decreased Serum Neurotrophin-3 in Chronically Medicated Schizophrenic Males. *Neurosci Lett.* 2008, 440(3):197-201
120. Wadee AA, Kuschke RH, Wood LA, Berk M, Ichim L, Maes M. Serological observations in patients suffering from acute manic episodes. *Hum Psychopharmacol.* 2002, 17(4):175-179.

121. Wall L, Burke F, Barton C, Smyth J, Balkwill F. IFN-gamma induces apoptosis in ovarian cancer cells in vivo and in vitro. *Clin Cancer Res.* 2003, 9(7):2487-2496.
122. Weissman MM, Bland RC, Canino GJ, Faravelli C, Greenwald S, Hwu HG, Joyce PR, Karam EG, Lee CK, Lelouch J, Lépine JP, Newman SC, Rubio-Stipe M, Wells JE, Wickramaratne PJ, Wittchen H, Yeh EK. Cross-national epidemiology of major depression and bipolar disorder. *Journal of American Medical Association* 1996, 276(4):292-295.
123. Wong CT, Tsoi WF, Saha N. Acute phase proteins in male Chinese schizophrenic patients in Singapore. *Schizophr. Res.* 1996, 22(2):165-171.
124. Woods BT. Is schizophrenia a progressive neurodevelopmental disorder? Toward a unitary pathogenetic mechanism, *Am. J. Psychiatry* 1998, 155:1661-1670.
125. Wrona Neural-immune interactions: an integrative view of the bidirectional relationship between the brain and immune systems. *J Neuroimmunol.* 2006, 172(1-2):38-58.
126. Yoshida H. ER stress and diseases. *FEBS Journal*, 2007, 274(3):630-658.
127. Young J, McKinney SB, Ross BM, Wahle KW, Boyle SP. Biomarkers of oxidative stress in schizophrenic and control subjects. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2007, 76(2):73-85.
128. Zhang XY, Zhou DF, Cao LY, Zhang PY, Wu GY. Elevated blood superoxide dismutase in neuroleptic-free schizophrenia: association with positive symptoms. *L. Psychiatric. Res.* 2003, 117(1):85-88.