

**UFRGS – UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA**

**AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES DE RISCO CARDIOVASCULAR EM  
PACIENTES COM TRANSTORNO DE HUMOR BIPOLAR**

*Fábria Chiarani*

**Orientador:** Prof. Dr. Flávio Kapczinski

**Co-orientador:** Profa. Dra. Angela Terezinha de Souza Wyse

*Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito para obtenção do grau de Doutor em Bioquímica.*

**Porto Alegre, 2012**

*... À Deus, por me dar força e perseverança*

*“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original.”*

*Albert Einstein*

## **Agradecimentos**

*Ao meu orientador e co-orientadora pelo incentivo, oportunidade e exemplo.*

*Aos professores da banca examinadora*

*À professora Keila Maria Ceresér e ao professor Maurício Kunz pelos apontamentos e disposição.*

*À todos os colegas do Laboratório de Psiquiatria Molecular pelo auxílio e amizade.*

*Aos funcionários do Programa de Pós Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e do Departamento de Bioquímica da UFRGS, pela dedicação e atenção.*

*À professora Carmen Vargas e a doutora Angela Sitta do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pela colaboração.*

*À minha família pelo incentivo e preocupação.*

*Ao órgão financiador, FIPE (HCPA) e a UFRGS pela oportunidade.*

***Em especial, ao meu namorado, Leonardo, pela compreensão, amor, carinho, incentivo e ajuda.***

## Sumário

PARTE I.....	1
Resumo.....	1
1. Introdução .....	7
1.1. Fisiopatologia do Transtorno de Humor Bipolar .....	8
1.1.1. Alterações estruturais .....	8
1.1.2. Bases neuroquímicas.....	9
1.1.3. Comorbidades.....	12
1.2. Doenças cardiovasculares.....	14
1.3. Biomarcadores de risco cardiovascular .....	16
1.3.1. Homocisteína .....	16
1.3.2. Folato .....	21
1.3.3. Creatina Kinase .....	22
1.3.4. Proteína C-reativa .....	23
1.3.5. Ferritina.....	24
1.3.6. Metaloproteinases de Matriz Extracelular .....	26
2. Objetivo geral .....	30
2.1. Objetivos específicos.....	30
3. Resultados .....	31
3.1. Capítulo I .....	32

3.2. Capítulo II .....	53
PARTE III.....	71
4. Sumário dos resultados.....	71
5. Discussão.....	72
6. Conclusões .....	81
7. Conclusão Geral.....	83
8. Perspectivas.....	84
9. Bibliografia .....	85
10. Anexo 1: Lista de Figuras.....	109
11. Anexo 2: Termo de Consentimento.....	110
12. Anexo 3: Escala YMRS (mania).....	112
13. Anexo 4: Escala Hamilton (depressão) .....	121
14. Anexo 5: Aprovação do Comitê de Ética.....	129
15. Detalhamento Estatístico .....	132

## PARTE I

### RESUMO

A prevalência do transtorno de humor bipolar (THB) na população mundial é em média 4%. Essa doença psiquiátrica está associada a elevadas taxas de mortalidade, principalmente devido a doenças cardiovasculares (DCVs). Pacientes com THB apresentam risco duas vezes maior de desenvolver doenças cardiovasculares em relação à população geral. Componentes importantes das DCVs incluem disfunção endotelial, ativação plaquetária, ativação imunológica e inflamação. Para este estudo foram avaliados biomarcadores associados com risco de doença cardiovascular em pacientes bipolares. Os níveis séricos de homocisteína, folato, vitamina B12, ferritina, creatina kinase e proteína C-reativa foram medidos em pacientes com THB em dois momentos: durante um episódio maníaco e após a remissão dos sintomas. A expressão do mRNA de MMP-2 e MMP-9, em sangue total, também foi analisada. Todos os parâmetros foram comparados com controles saudáveis. Pacientes e controles estavam aparentemente livres de doenças cardiovasculares. A expressão da MMP-2 mostrou uma relação negativa em relação ao IMC nos pacientes com THB nos estados maníaco e eutímico, enquanto que essa relação foi positiva nos indivíduos controles. Os níveis de ferritina se mostraram reduzidos apenas durante os episódios de mania. Não foram verificadas diferenças estatisticamente significantes nos demais biomarcadores estudados quando comparados os pacientes com THB e os controles. Exceto para a ferritina, todos os resultados obtidos durante o episódio de mania persistiram após a recuperação sintomática nos pacientes com THB. Nossa análise não valida a utilidade desses biomarcadores para diferenciar diferentes estados de humor quanto ao risco de DCV. É provável que a utilidade desses

biomarcadores na caracterização de maior risco em indivíduos com doença cardiocascular estabelecida se justifique mais do que o seu uso como indicadores de risco de futuros eventos cardiovasculares. A possível relação da homocisteína com risco de doença cardiocascular no THB não foi observada após correção para o IMC. A diferença no padrão de expressão da MMP-2 no THB precisa ser investigada bem como, outros indicadores de remodelamento tecidual e inflamação. Os resultados mostram a importância da inclusão do IMC como uma covariável em estudos para investigar o risco cardiocascular no THB. Um adequado acompanhamento no que diz respeito ao desenvolvimento de comorbidades médicas em pacientes bipolares deve ser implantado.

## **Abstract**

The prevalence of BD is thought to be around 4% of the population. This psychiatric disorder is associated with increased mortality due to medical causes, most notably cardiovascular disease (CVD). Two-fold increased risk of cardiovascular disease has been found among adults with bipolar disorder versus general population. Important components of CVD include endothelial dysfunction, platelet and immune activation and inflammation. We evaluated biomarkers associated with increased risk of cardiovascular disease in bipolar patients. The serum levels of homocysteine, determinants of homocysteine metabolism such as folate and vitamin B12, ferritin, creatine kinase and C-reactive protein were measured in bipolar patients in two separate instances: during acute mania and after remission of manic symptoms. The mRNA expression of MMP-2 and MMP-9 in total blood was also evaluated. All parameters were compared with healthy controls. Patients and controls were free of clinically apparent cardiovascular disease. The mRNA levels for MMP2 were negatively associated with BMI in the BD and positively associated with BMI in controls. Ferritin levels were reduced only during mania. No statistically significant differences were found in the other markers comparing bipolar patients and controls. Except ferritin, the results persist across symptomatic recovery within the same bipolar patient. The biomarkers selected can not differentiate mood states as the cardiovascular risk. May be these biomarkers may be most useful to characterize risk in individuals with an established CVD than using biomarkers as sole risk predictors of future CHD events. Our findings show the importance of assessing the BMI as a covariate in studies to investigate the cardiovascular risk in bipolar disorder.

It is crucial to highlight the necessity of appropriate monitoring concerning development of medical comorbidities in bipolar patients.

## **Lista de Abreviaturas**

DNA = Ácido Desoxirribonucleico

ATP = Adenosina Trifosfato

CK = Creatina Kinase

DCV = Doenças Cardiovasculares

DNMT1 = DNA Metiltransferase 1

eNos = Óxido Nítrico Sintase Endotelial

ERO = Espécies Reativas de Oxigênio

GPx = Glutathiona Peroxidase

GSK-3 = Glicogênio Sintase Cinase-3

HAECs = Células Endoteliais de Aorta Humana

Hcy = Homocisteína

HHcy = Hiperhomocisteína

ICAM-1 = Molécula de adesão intercelular 1

IL = Interleucinas

MCP-1 = Proteína 1 Quimioatraente de Monócitos

MMP = Metaloproteinases de matriz extracelular

NAD(P)H oxidase = nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato-oxidase

NF-KB = Fator Nuclear KB

NO = Óxido Nítrico

PCR = Proteína C-reativa

PCR= Reação em cadeia da Polimerase

PPARs-gama = Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama

RE = Retículo Endoplasmático

RNAm = Ácido Ribonucleico Mensageiro

SAH = S-adenosil-homocisteína

SAM = S-adenosil- metionina

SREBPs = Elemento Regulador de Esterol

TIMP = Inibidor Tecidual de Metaloproteinases

VSMC = Células do Músculo Liso Vascular

## 1. INTRODUÇÃO

O transtorno de humor bipolar é uma condição neurológica crônica caracterizada por variações cíclicas de humor associada a um prejuízo funcional substancial (Emilien et al, 2007). Além da regulação emocional anormal, essa doença também envolve distúrbios cognitivos, motores, autonômicos, endócrinos e do sono (Quiroz et al, 2008).

As taxas de morbidade e mortalidade são aproximadamente duas vezes maiores nos pacientes bipolares comparadas à população geral (Sowden e Huffman, 2009). O THB é uma das doenças de saúde mental de maior custo, sendo 40% dos custos relacionados a cuidados médicos gerais (Kilbourne et al, 2007).

Essa doença atinge 4% da população mundial (Merikangas et al, 2011). Aproximadamente 60% dos pacientes com THB apresentam os primeiros sintomas da doença antes dos 20 anos de idade. O início precoce do THB está associado com um curso mais grave da doença e um pior prognóstico (Oedegaard et al, 2009) .

O THB ainda não é adequadamente diagnosticado já que não se conhece um marcador biológico para esse transtorno. O diagnóstico é baseado na avaliação subjetiva do médico. O tempo médio entre o início dos sintomas e o correto diagnóstico é superior a 7 anos (Mantere et al, 2004). O retardo do diagnóstico pode aumentar o risco de comorbidades (Berk et al, 2007a).

O THB é caracterizado por períodos alternados de mania, hipomania, episódios depressivos e estados mistos. Os episódios de depressão se caracterizam por distúrbios do sono, dificuldade de concentração, retardo psicomotor e ideação

suicida, enquanto que os episódios de mania se caracterizam por grandiosidade, euforia, pensamentos racistas, redução da necessidade de sono, aumento da energia e do impulso sexual (Zarate et al, 2005). Repetidos episódios depressivos podem preceder a manifestação do primeiro episódio de mania que determina o diagnóstico de bipolaridade (Judd et al, 2002). Os episódios recorrentes de mania e depressão do THB são interceptados por períodos de remissão dos sintomas ou eutímia. O curso natural do THB inclui um encurtamento progressivo dos intervalos entre os episódios depressivos e/ou maníacos (Ågren e Backlund, 2007).

O THB é uma doença multifatorial, resultado da combinação de diferentes perfis genéticos, influências ambientais incluindo estressores crônicos e experiências traumáticas. De acordo com o modelo de “sensibilização” de Post (2007), o acúmulo de estresse recorrente, abuso de substâncias e múltiplos episódios da doença podem representar alterações permanentes na atividade neuronal, alterando a expressão de genes e mecanismos neurobiológicos que implicam em uma maior probabilidade de recorrências e menor resposta aos medicamentos.

## **1.1. Fisiopatologia do Transtorno de Humor Bipolar**

### **1.1.1. Alterações estruturais**

A literatura relacionada às anormalidades neuroanatômicas está direcionada principalmente para regiões cerebrais que regulam a cognição e o afeto. Em um estudo de meta-análise, Kupferschmidt e Zakzanis (2011) verificaram uma hiperatividade límbica e uma hipoatividade frontal em paciente com THB. Estes achados foram mais pronunciados durante a mania do que na depressão.

O comprometimento de regiões frontais como córtex pré-frontal dorsolateral e córtex orbitofrontal (Savitz e Drevets, 2009), pode levar a desinibição de estruturas límbicas, como amígdala e hipocampo e conseqüentemente uma desregulação do estado de humor com inapropriada intensidade emocional.

Tem-se associado o aumento do volume ventricular ao número de episódios afetivos prévios, sugerindo uma redução gradual das estruturas periventriculares com o avanço da doença (Brambilla et al, 2001;Strakowski et al, 2005). Além disso, verificou-se em pacientes maníacos e eufímicos uma hipoativação do cuneus, estrutura envolvida na resposta inibitória (Kempton et al, 2008).

Estudos mostram que pacientes com THB recorrente apresentaram aumento no volume de regiões do tálamo, córtex cingulado anterior, girofusiforme e cerebelo, além de anormalidades na massa cinzenta (Adler et al, 2007).

### **1.1.2. Bases neuroquímicas**

Inicialmente, as pesquisas sobre a neurobiologia do THB estavam voltadas para o estudo das aminas biogênicas, subseqüentemente foram incluídos o sistema de segundo mensageiro intracelular, citocinas inflamatórias, neurotrofinas, estresse oxidativo e alterações epigenéticas (Berk et al, 2011).

Os estudos iniciais são bastante variáveis e apontam para uma complexa interconexão entre os sistemas de neurotransmissores. Estudos sugerem que a redução da função da serotonina concomitante ao aumento da noradrenalina pode estar envolvida na genese da mania (Shiah e Yatham, 2000). O aumento da atividade dopaminérgica, também tem sido relacionado ao desenvolvimento dos sintomas maníacos, enquanto que a redução pode ser correlacionada com depressão (Ackenheil, 2001). O sistema glutamatérgico parece comprometer a

neuroplasticidade e resiliência celular em pacientes bipolares (Du et al, 2004 e 2008).

Entretanto, alguns pesquisadores acreditam na hipótese da modulação da plasticidade sináptica e neural mediando a função cognitiva e afetiva desse transtorno de humor (Martinowich et al, 2009).

Várias cascatas de sinalização têm sido alvo da ação dos medicamentos utilizados no THB. Estudos em paciente com THB verificaram que o lítio inibe a Glicogênio Sintase Cinase-3 (GSK-3), uma proteína que regula a apoptose, plasticidade celular e resiliência (Chalecka-Franaszek e Chuang, 1999; Zhang et al, 2003; Lie et al, 2005).

Além disso, a inibição da via de sinalização da proteína cinase C, importante na regulação da excitabilidade neuronal, liberação de neurotransmissores, alteração da expressão de genes e plasticidade, tem se mostrado alvo do lítio e valproato em pacientes com THB (Hahn e Friedman, 1999; Manji e Lenox, 1999).

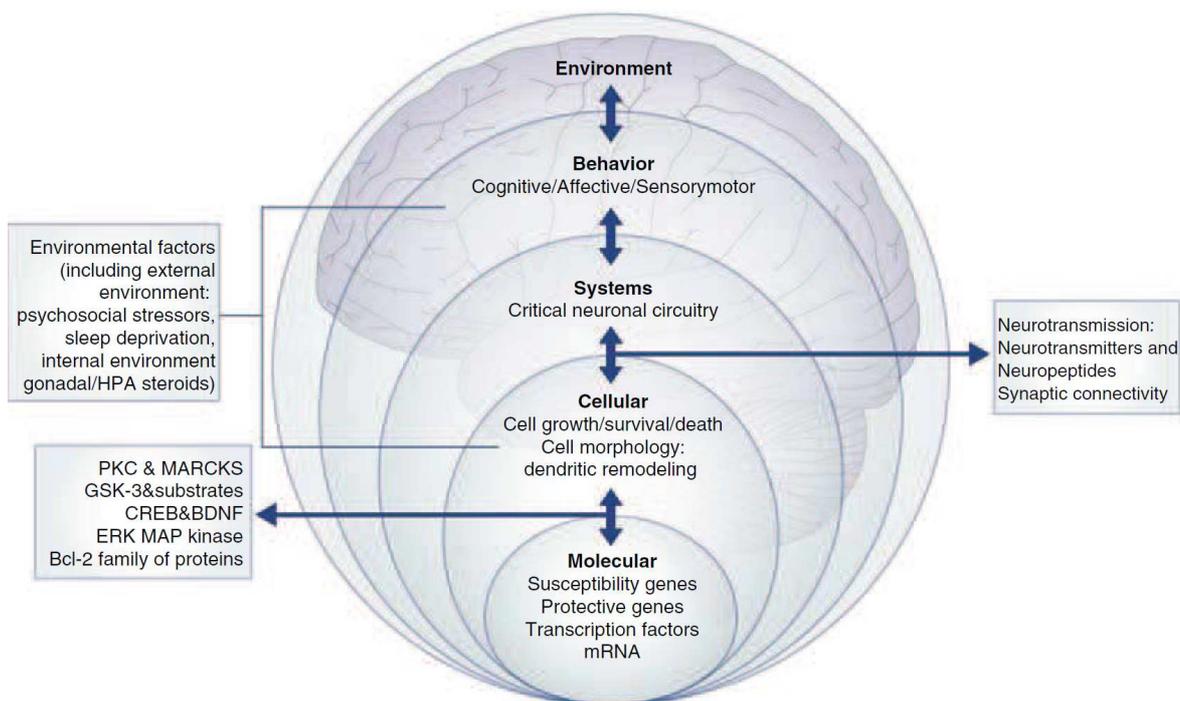
A patofisiologia do THB parece também estar associada à alterações de neurotrofinas e citocinas. Kauer-Sant'anna et al (2009) verificaram um aumento das citocinas pró-inflamatórias IL-6 and TNF- $\alpha$  nos estágios iniciais e avançados da doença enquanto que IL-10, uma citocina anti-inflamatórias, aumentou apenas nos estágios iniciais. Redução dos níveis de BDNF foi observada em estágios avançados do THB.

Estes trabalhos corroboram com evidências preliminares sugerindo que as alterações bioquímicas podem ser dependentes do estágio da doença (Berk et al, 2007b) e também com a teoria de Post (2007) onde falhas de mecanismos compensatórios podem ocorrer com a progressão da doença.

Pesquisas realizadas em sangue periférico de pacientes com THB demonstraram alterações na atividade de enzimas antioxidantes, corroborando com a hipótese de envolvimento do dano oxidativo neste transtorno (Ng et al, 2008; Berk et al, 2008). Esses pacientes apresentaram também aumento do dano ao DNA em linfócitos (Andreazza et al, 2007) e acelerado encurtamento dos telômeros, um marcador de senescência (Simon et al, 2006).

Além disso, disfunção mitocondrial pode estar envolvida no déficit do metabolismo energético cerebral, comprometimento da sinalização do cálcio e apoptose encontrados no THB (Quiroz et al, 2008).

Kapczinski et al, (2008) sugerem a hipótese da carga alostática, conceituada como um desgaste cumulativo causado por estressores, pela própria doença e agravada por fatores como uso de substâncias. Esse desgaste pode, através de mecanismos oxidativos e inflamatórios, levar ao declínio cognitivo e a redução da resposta ao tratamento.



**Figura 1.** A patofisiologia do THB: Diferentes sistemas em diferentes níveis fisiológicos nos quais essa doença se manifesta: molecular, celular e comportamental (Schloesser et al, 2008).

### 1.1.3. Comorbidades

Associadas ao THB, freqüentemente coexistem condições médicas como, obesidade, doenças cardiovasculares, diabete mellitus e doenças da tireóide que exacerbam os sintomas da doença (Kupfer, 2005).

As taxas de mortalidade em pacientes com THB, devido a doenças cardiovasculares, são duas vezes superior a da população geral. Depois dos suicídios, as doenças cardiovasculares aparecem como principal causa de morte nesses pacientes (Portilla et al, 2009).

Quando comparados aos pacientes com depressão unipolar, os pacientes com THB apresentam taxas de mortalidade por doenças cardiovasculares bastante superiores (Ösby et al., 2001; Angst et al., 2002). Em relação aos pacientes com

esquizofrenia, a prevalência de fatores de risco cardiovasculares dos pacientes bipolares é similar (Birkenaes et al, 2007). Correll et al (2008), reportaram um risco de doença cardíaca coronariana, em 10 anos, de 4,7 % em pacientes com THB e 6,5 % em pacientes com esquizofrenia.

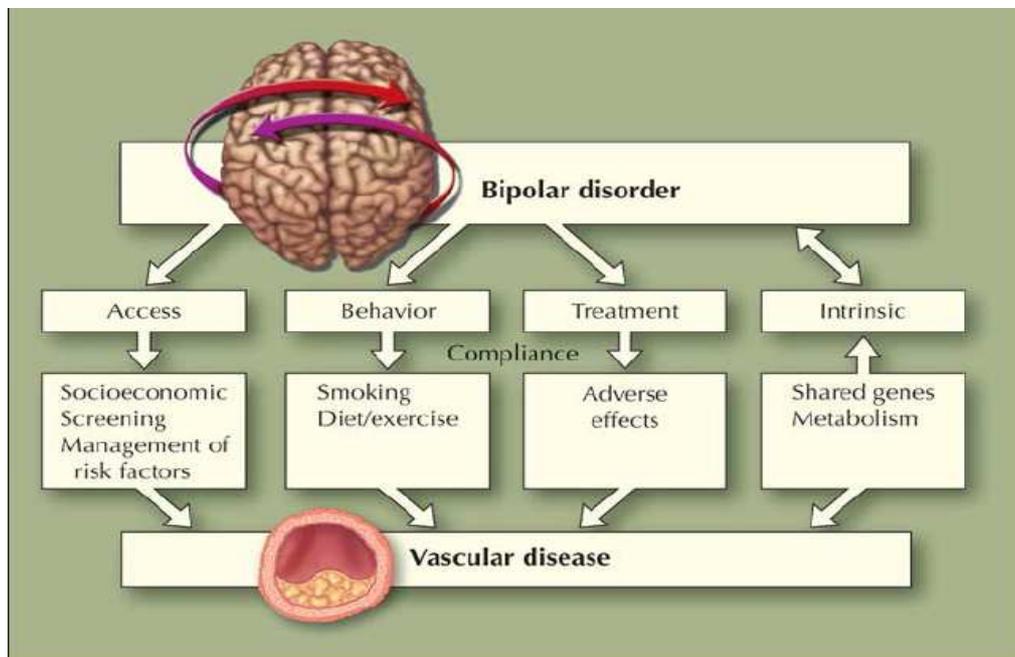
O excesso de mortalidade pode estar relacionado a algo ainda não identificado, a uma característica inerente à doença mental ou mediado por fatores de risco tradicionais para doença cardiovascular. Além disso, pode haver uma associação temporal entre essa doença afetiva e a comorbidade cardiovascular (Weiner et al, 2011).

O tratamento farmacológico associado ao THB pode contribuir para o risco cardiovascular. Estabilizadores de humor como lítio e valproato têm sido associados com ganho de peso (Bowden et al, 2000). Vários antipsicóticos atípicos parecem estar relacionados ao aumento de distúrbios metabólicos, incluindo significativo ganho de peso e alterações no metabolismo da glicose e lipídico (Marken e Pies, 2006; Guo et al, 2006).

Variáveis não farmacológicas como hábitos alimentares, sedentarismo, redução do metabolismo basal durante a depressão, fumo e outras substâncias de abuso podem influenciar no risco cardiovascular (Kilbourne et al, 2007; Lasser et al, 2000; Vornik e Brown, 2006).

A síndrome metabólica é mais prevalente em pacientes com THB comparado a população geral (Fagiolini et al, 2008; Garcia-Portilla et al, 2008). As anormalidades metabólicas impactam na qualidade de vida do paciente, bem como no curso da doença. A obesidade tem sido relacionada ao pior prognóstico na doença bipolar, maior frequência de episódios maníacos e depressivos, além de

maior número de tentativas de suicídio em relação aos pacientes com peso normal (Kolotkin et al, 2006).



**Figura 2.** Potenciais explicações para a associação entre o THB e doenças cardiovasculares (Murray et al, 2009).

## 1.2. Doenças cardiovasculares

As DCVs são a principal causa de morbidade e mortalidade no mundo, sendo responsáveis por mais de 17,3 milhões de mortes por ano (Mendis et al, 2011). No Brasil, em 2009, ocorreram 320.074 óbitos por doenças do aparelho circulatório. As DCV são responsáveis pela alta frequência de internações, ocasionando custos médicos e sócio-econômicos elevados (DATASUS, 2010).

Os fatores de risco clássicos para o desenvolvimento das DCVs explicam 50 a 75% da incidência de doenças vasculares (Messner e Bernhard, 2010). A identificação de novos fatores envolvidos no desenvolvimento das doenças cardiovasculares é o alvo das investigações. Há um sinergismo de ação entre

genética, ambiente, fatores sistêmicos e mecanismos epigenéticos que contribuem para o início e progressão das doenças cardiovasculares (Napoli, 2011).

A disfunção endotelial é o passo inicial no desenvolvimento da aterosclerose. Esse processo patológico está associado ao aumento da expressão de moléculas de adesão, aumento da síntese de fatores pró-inflamatórios e pró-trombóticos, aumento de estresse oxidativo e modulação anormal do tônus vascular (Sitia et al, 2010).

O óxido nítrico (NO) é fundamental na regulação do tônus vascular e função vasomotora. A redução da biodisponibilidade de NO predispõe a disfunção endotelial. O efeito vasodilatador do NO é equilibrado por fatores como endotelina-1 e angiotensina II (Puntmann et al, 2011).

O acúmulo de LDL (lipoproteína de baixa densidade) na parede vascular é também um evento primário na aterosclerose. As partículas de LDL sofrem oxidação no espaço subendotelial e são reconhecidas como auto-antígenos gerando estímulos pró-aterogênicos. As LDL oxidadas recrutam monócitos e linfócitos T circulantes constituindo as chamadas células espumosas (*foam cells*) no subendotélio da parede vascular (Dokken, 2008). Essas células liberam mediadores inflamatórios, promovem a proliferação de leucócitos, de células endoteliais e de células do músculo liso para formação da placa aterosclerótica (Lusis, 2000).

As complicações de maior importância clínica estão associadas à ruptura ou erosão da lesão (Libby e Theroux, 2005). A perda da integridade da placa aterosclerótica está relacionada à redução da síntese de colágeno pelas células do músculo liso vascular e ao aumento do seu catabolismo por clivagem proteolítica mediada pelas metaloproteinases de matriz extracelular (Libby, 2008).

Biomarcadores sanguíneos de inflamação, estresse oxidativo e trombose parecem potenciais ferramentas clínicas como preditores de risco cardiovascular (Packard e Libby, 2008).

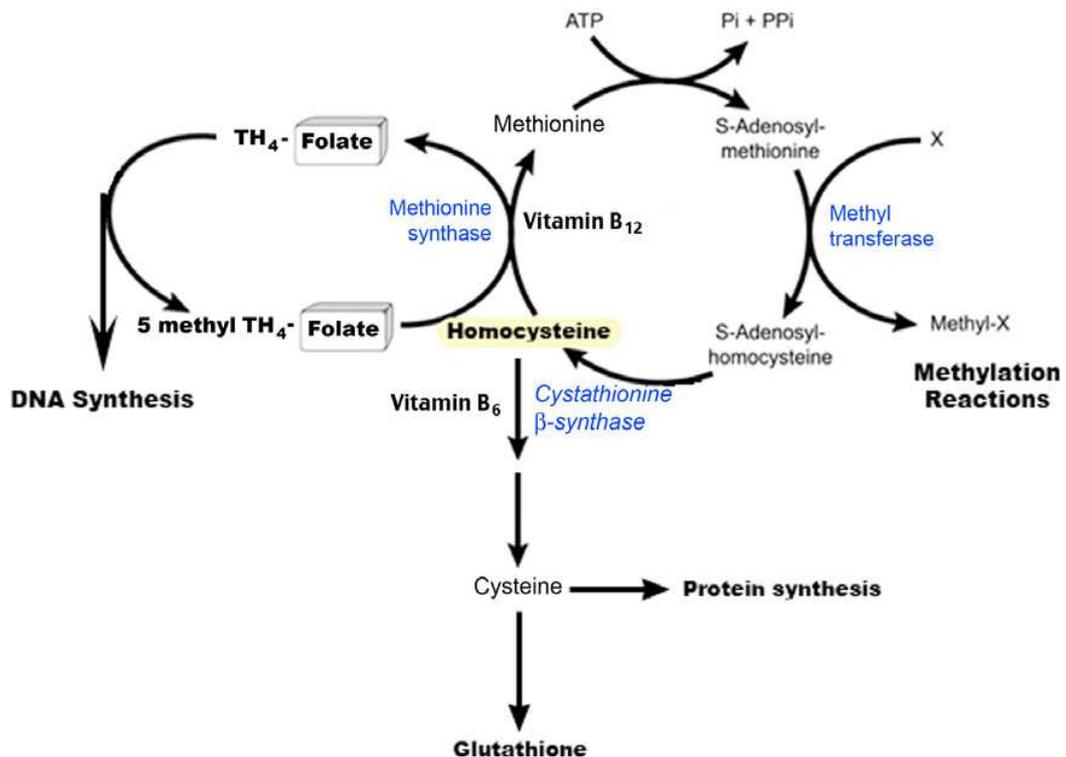
### **1.3. Biomarcadores de risco cardiovascular**

#### **1.3.1. Homocisteína**

A homocisteína (Hcy) é um aminoácido formado a partir da metionina como resultado de uma reação de metilação. A metionina é ativada por ATP para produzir S-adenosil-metionina (SAM), o doador universal de grupos metila para a metilação de ácidos nucleicos, proteínas, polissacarídeos e fosfolipídios. S-adenosil-L-homocisteína (SAH) é um subproduto das reações SAM-metiltransferases dependentes (Finkelstein, 1998).

Os níveis de homocisteína são regulados pela sua remetilação a metionina ou transsulfuração a cisteína. Na maioria dos tecidos, os grupos metila para reação de remetilação são derivados do 5-metiltetraidrofolato em uma reação dependente de vitamina B12, enquanto que no fígado e no rim o doador de grupos metil é a betaína (Selhub, 1999).

As reações de transsulfuração são irreversíveis e requerem vitamina B6 para sintetizar cisteína. A cisteína é um precursor da glutatona, uma molécula essencial para defesa celular em resposta ao estresse oxidativo (Finkelstein e Martin, 2000).



**Figura 3.** Metabolismo da Homocisteína. (Hoffman, 2011).

A homocisteína está presente no soro em várias formas e proporções: a forma livre reduzida (menos de 2%), forma conjugada por meio do radical sulfidril (SH) a proteínas plasmáticas (70 a 80%) e a forma combinada a outro aminoácido sulfurado (20 a 30%), formando homocistina (dímero da homocisteína) ou dissulfetos (p.ex. homocisteína-cisteína). Os níveis de homocisteína total no sangue são dosados através da redução desses dissulfetos (Refsum et al, 1985).

A hiperhomocisteinemia pode ser classificada em: moderada (16 – 30  $\mu\text{M}$ ), intermediária (31–100  $\mu\text{M}$ ) e grave (>100  $\mu\text{M}$ ) (Cheng e Kaplowitz, 2004). Os níveis normais de homocisteína em humanos ficam entre 5 e 15  $\mu\text{M}$  (Lentz e Haynes, 2004; Ueland et al, 1993).

Os principais fatores relacionados aos níveis elevados de homocisteína incluem deficiência das vitaminas B6, B12 e folato, problemas renais (clearance da

Hcy é 70% renal) e erros inatos do metabolismo da homocisteína (deficiência das enzimas cistationina  $\beta$ -sintase e metilenotetraidrofolato redutase). Algumas drogas como carbamazepina, metotrexato, metformina, fibratos e levodopa, além de psoríase, câncer e hipotireoidismo podem causar hiperhomocisteinemia leve (Abraham e Cho, 2010).

McCully, em 1969, foi o primeiro a propor a hipótese de associação entre doenças vasculares e hiperhomocisteinemia. Estudos subsequentes foram realizados para avaliar a conexão metabólica da hiperhomocisteinemia com as doenças vasculares, entretanto os resultados ainda são contraditórios.

Um estudo de metanálise indicou que a cada aumento de 5  $\mu\text{mol/L}$  nas concentrações séricas de Hcy, tem-se um aumento de 20 a 30% no risco de doença cardíaca isquêmica (Wald et al, 2002). O aumento nos níveis plasmáticos de homocisteína tem sido positivamente associado ao grau de gravidade de insuficiência cardíaca em pacientes com infarto do miocárdio prévio (Agoston-Coldea et al, 2011; Washio et al, 2011).

Resultados de uma pesquisa demonstram que 40% dos pacientes diagnosticados com doença arterial coronariana, doença vascular periférica e trombose venosa exibem hiperhomocisteinemia (Lawrence de Koning et al, 2003). Uma relação causal entre elevados níveis de homocisteína e aterosclerose tem sido reportada (Zhou e Austin, 2009).

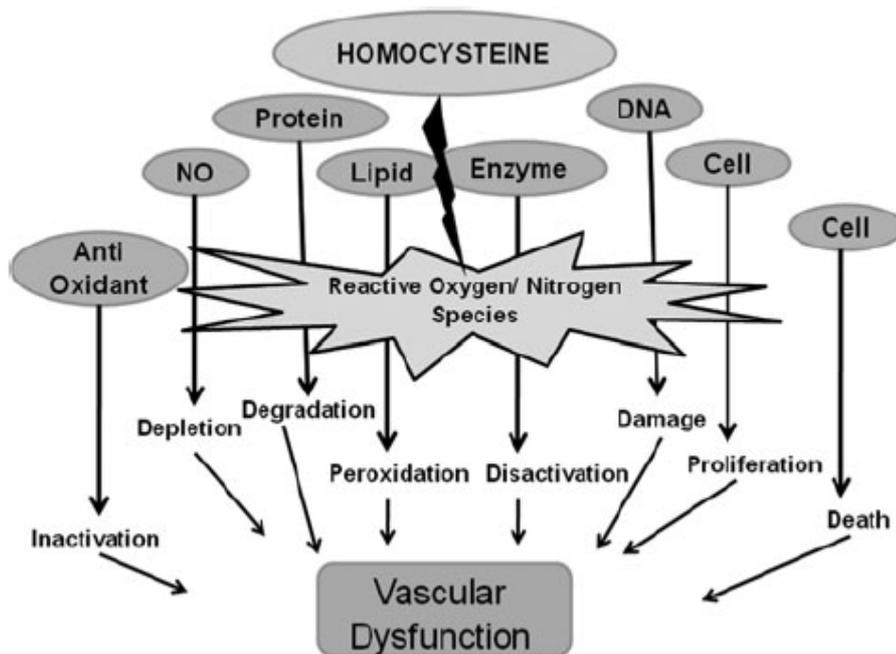
Estudos *in vitro* confirmam a propriedade pró-inflamatória da Hcy em células do músculo liso vascular, endotélio e monócitos, através da indução de quimiocina (IL-8 e MCP-1), aumento da expressão de citocinas (IL-1, IL-6, IL12) e moléculas de adesão das células endoteliais (P-selectina, E-selectina, ICAM-1) (Desai et al, 2001;

Zeng et al, 2003; Su et al, 2005; Wang, 2001; Alkhoury et al, 2011). A Hcy exerce efeito estimulatório em outros mediadores inflamatórios, incluindo proteína C-reativa (PCR) (Holven et al, 2006).

Um dos mecanismos moleculares que medeia estes efeitos da Hcy parece envolver a ativação do fator nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), através da geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) decorrente da estimulação de NAD(P)H oxidase pela Hcy (Au-Yeung et al, 2004). As ERO geradas pela oxidação da Hcy (superóxido e peroxinitrito) também promovem a redução da atividade da óxido nítrico sintase endotelial (eNos) desencadeando disfunção endotelial através do comprometimento da geração do óxido nítrico (Zhang et al, 2000; Dayal and Lentz 2005).

Em cultura de células endoteliais a Hcy reduziu a atividade da Glutathione Peroxidase (GPx) comprometendo o sistema de defesa antioxidante (Handy et al, 2005).

Apoptose mediada pela Hcy foi observada em células endoteliais cardíacas de ratos, através da produção de ERO e disfunção mitocondrial. (Tyagi et al, 2006). Além disso, a homocisteína, através da sua ação oxidante, promoveu a liberação de  $Ca^{+2}$  das reservas intracelulares e conseqüentemente, disfunção e estresse do retículo endoplasmático (ER) (Li et al, 2011). Em um modelo animal de hiperhomocisteinemia (HHcy), observou-se disfunção do remodelamento endotelial através do desequilíbrio da razão colágeno/elastina e MMP/TIMP (Basu et al, 2011). A Hcy parece favorecer a formação de trombos através do seu efeito na adesão e agregação plaquetária e em alguns fatores de coagulação (Lijfering et al, 2007; Olas et al, 2008). Tem-se sugerido que elevados níveis de homocisteína podem promover a oxidação de LDL (Seo et al, 2010).



**Figura 4.** Efeito molecular do estresse oxidativo mediado pela Hcy. Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio geradas pela hiperhomocisteinemia promovem dano molecular e consequentemente disfunção vascular (Steed et al, 2011).

A Hcy pode sofrer um processo de homocisteinilação catalizado pela enzima metionil-tRNA sintetase, formando Hcy-tiolactona, um éster bastante reativo. A Hcy-tiolactona pode modificar a estrutura e função de proteínas induzindo apoptose e resposta autoimune e inflamatória nas células endoteliais (Kerkeni et al, 2006; Jakubowski, 2004 e 2005). A homocisteinilação do fibrinogênio tem sido relacionada a alterações na estrutura e no processo de dissolução do coágulo de fibrina (Sauls et al, 2006).

Redução dos níveis de homocisteína foi relatado em pacientes tratados com folato e vitaminas B6 e B12 (Clarke et al, 2002). Apesar da redução nos níveis de homocisteína, o folato não parece reduzir a incidência de infarto do miocárdio, acidente cérebro-vascular e doença cardíaca coronariana (Clarke et al, 2011; Zhou et al, 2011).

A hipótese da causalidade da Hcy foi contestada através da interpretação de um estudo indicando um possível efeito do dano vascular na concentração de homocisteína, sugerindo a importância da Hcy como um marcador e não como causa de DCV (Kaul et al, 2006).

A SAH tem sido sugerida como um melhor indicador de DCV que a Hcy (Kerins et al, 2001). Aumento de SAH promove um feedback inibitório de metiltransferase dependente de SAM, incluindo DNA metiltransferases (James et al, 2002). Inibição da atividade da DNA metiltransferase 1 (DNMT1), resulta em demetilação do promotor da ciclina A e supressão da transcrição do gene da ciclina A, o que promove parada do ciclo celular G1/S e conseqüentemente inibição do crescimento das células endoteliais. Redução da reendotelização, associada à proliferação das células do músculo liso vascular, favorecem o processo aterosclerótico (Jamaluddin et al, 2007).

O acúmulo de SAH associado ao aumento de Hcy inibe a metilação “de novo” de fosfolípidios, importante no metabolismo de ácidos graxos insaturados, alterando a composição da membrana lipídica. Essa alteração induz estresse do retículo endoplasmático com ativação das proteínas ligadas ao elemento regulador de esterol (SREBPs) capaz de ativar genes que codificam a biossíntese de lipídios os quais podem ser responsáveis pelo desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Tehlivets, 2011).

### **1.3.2. Folato**

Depleção de folato tem sido associada ao aumento dos níveis de homocisteína. Um estudo demonstrou que a ingestão de 15mg/dia de folato e

1mg/dia de vitamina B12 reduziu em 30% a concentração plasmática de Hcy em pacientes em hemodiálise (Azadibakhsh et al, 2009).

O folato tem sido implicado como um varedor de radicais peroxil e hidroxil (Joshi et al, 2001). Estudos sugerem que propriedades antioxidantes do folato podem melhorar a função vascular através de mecanismos independentes dos seus efeitos nos níveis de homocisteína (Ashfield et al, 2001; Doshi et al, 2002).

### **1.3.3. Creatina Kinase**

Enzimas séricas como Creatina Kinase (CK) têm sido avaliadas como marcadores cardíacos indicativos de dano ao miocárdio. A CK é encontrada em músculo cardíaco, mas também em músculo esquelético, cérebro, rim e em menor quantidade, em pulmão e trato gastrointestinal. Devido a esta inespecificidade, a CK total é utilizada como teste de investigação para avaliar a necessidade de testes mais específicos como a isoenzima CK-MB (Karras e Kane, 2001).

Pacientes com síndrome coronariana aguda apresentaram significativa correlação entre elevados níveis de CK e incidência de mortalidade ou infarto. A elevação da CK é sugerida como um preditor de pior desfecho cardíaco (Savonitto et al, 2002).

Níveis elevados de CK mostraram-se de importância prognóstica em pacientes submetidos à intervenção coronariana percutânea com elevação do segmento ST. Os picos de CK foram associados a uma menor fração de ejeção do ventrículo esquerdo, maior tempo de hospitalização e maior mortalidade no período de um ano (Nienhuis et al, 2008). Elevação do pico de CK tem sido reportada como indicador na avaliação de ruptura do miocárdio secundária ao infarto do miocárdio (Yuan et al, 2011).

#### 1.3.4. Proteína C-reativa

A proteína-C-reativa (PCR) é considerada um marcador sensível, mas não específico, de doenças inflamatórias, e tem sido associada a doenças cardiovasculares. Além de ser considerada um marcador inflamatório de aterosclerose e eventos coronarianos, a PCR é também um mediador da doença, pois contribui na formação da lesão, ruptura da placa e trombose coronariana por interagir e alterar o fenótipo das células endoteliais (Wang et al, 2003).

Algumas evidências sugerem que a PCR pode ter um efeito pró-inflamatório direto. Elevados níveis de PCR promoveram aumento na expressão de moléculas de adesão endotelial, tais como, molécula-1 de adesão à célula vascular (VCAM-1), molécula-1 de adesão intercelular (ICAM-1) e E-selectina em cultura de células endoteliais de veia umbilical (Wadham et al, 2004).

A propriedade aterogênica da PCR tem sido mostrada em células endoteliais de aorta humana (HAECs) através da indução da síntese e expressão da IL-8, um potente quimioatraente que medeia a adesão célula endotelial-monócito, através da transcrição de NF-kappa B (Devaraj et al, 2004).

Um grupo de pesquisadores verificou a ação inibitória da PCR sobre a enzima eNOS em HAECs, através da redução da disponibilidades de tetrahydrobiopterina (BH4), um cofator da enzima, da produção de superóxido via NADPH oxidase, e também alteração na fosforilação e dimerização da eNOS (Singh et al, 2007). Os efeitos pró-aterogênicos da PCR são mediados pela sua ligação a receptores Fcγ1 (CD64) e Fcγ2 (CD32) das células endoteliais (Devaraj et al, 2005).

A PCR também apresenta um efeito pró-aterogênico direto nas células do músculo liso vascular. A PCR aumenta a expressão dos receptores tipo 1 de

angiotensina (AT1- R) e potencia o efeito da angiotensina no desenvolvimento e progressão da aterosclerose, na migração, proliferação e produção de espécies reativas de oxigênio (Wang et al, 2003).

Um modelo de camundongos transgênicos expressando PCR humana demonstrou que a superexpressão da PCR está envolvida no processo de remodelamento adverso do ventrículo esquerdo após infarto do miocárdio, promovendo dilatação ventricular esquerda e perda funcional. Este estudo também verificou aumento da taxa apoptótica (aumento da expressão de Bax e redução da expressão de Bcl2), infiltração de macrófagos, aumento da expressão da proteína quimiostática de monócitos (MCP-1) e da expressão e atividade da metaloproteinase de matriz extracelular-9 (MMP-9) na zona border do infarto (Takahashi et al, 2010).

### **1.3.5. Ferritina**

O ferro é essencial para muitas funções celulares, tais como transporte de oxigênio e elétrons, fixação de nitrogênio e síntese de desoxinucleotídeos. Entretanto, o ferro livre pode catalisar a formação de espécies reativas de oxigênio como radical hidroxil e peróxido de hidrogênio, via reações de Fenton (Halliwell e Gutteridge, 1989).

O indicador mais utilizado para avaliar as concentrações de ferro é o nível sérico de ferritina. A ferritina é uma proteína globular que age como um tampão contra deficiência ou sobrecarga de ferro. Uma molécula de ferritina pode conter até 4.500 átomos de ferro (Fe III) (Iancu, 2011).

Os estudos ainda são conflitantes em relação à associação entre a sobrecarga de ferro e doenças cardiovasculares. A “hipótese do ferro” para doença arterial coronariana foi proposta primeiramente por Sullivan em 1981.

Evidências da elevada concentração de ferritina como fator de risco para doença cardíaca isquêmica via oxidação de LDL tem sido observadas. Homens com níveis de ferritina superior a 200µg/L mostraram 2,2 vezes maior risco de infarto agudo do miocárdio (Salonen et al,1992).

Os níveis séricos de ferritina em indivíduos saudáveis foram positivamente associados aos níveis de malondealdeído, um biomarcador de lipoperoxidação (Mendes et al, 2009).

A ferritina tem sido associada a alterações no metabolismo lipídico. Altas concentrações de ferritina foram significativamente associadas ao aumento na concentração plasmática de triglicerídeos e LDL oxidado, bem como, redução do HDL (lipoproteína de alta densidade). A concentração de ferritina mostrou-se um preditor independente da atividade da Lipoproteína associada à fosfolipase A2 (Lp-PLA2), um marcador inflamatório de risco cardiovascular (Meroño et al, 2011).

Tuomainen et al, 2003 observaram uma associação direta entre os níveis séricos de ferritina e os oxisteróis circulantes, produtos ativos no desenvolvimento do processo aterosclerótico.

Estudo realizado na população sul coreana, verificou a associação entre as concentrações de ferritina e o aumento na incidência de síndrome metabólica e diabetes mellitus (Lee et al, 2011).

Suh et al, 2000 verificaram, em fígado de ratos, uma importante função enzimática da ferritina no catabolismo do folato. Altos níveis de ferritina foram associados à baixa disponibilidade de folato e conseqüentemente baixas taxas de remetilação da homocisteína. Alguns trabalhos mostram o efeito da perturbação da

concentração do ferro, sobre os efeitos deletérios da homocisteína na função endotelial (Zheng et al, 2002 e 2006).

Contrariamente, alguns estudos não confirmam a associação entre a ferritina e o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Sempos et al, 2000; Knuiman et al, 2003). Uma revisão publicada recentemente mostra a ação da ferritina como antioxidante, devido a sua capacidade de sequestrar ferro livre, um inibidor de muitas enzimas serina-proteases, envolvidas nos processos de angiogênese, coagulação e formação da placa aterosclerótica. Enquanto que a atividade pró-oxidante da ferritina pode ocorrer pela interação com moléculas capazes de liberar o ferro, através de redução, quelação ou abertura de poros (Watt, 2011).

### **1.3.6. Metaloproteinases de Matriz Extracelular**

As metaloproteinases de matriz extracelular (MMPs), endopeptidases zinco dependentes, são sintetizadas por componentes estruturais da parede vascular (células do músculo liso e células endoteliais), por células inflamatórias, principalmente macrófagos, e por plaquetas (Bäck et al, 2010).

Em mamíferos são conhecidas 24 MMPs, que historicamente foram distribuídas em grupos de acordo com sua estrutura primária, especificidade de substrato e localização subcelular: gelatinases, colagenases, estromelina, matrilina, metaloelastases e MMP tipo-membrana. Atualmente as MMPs possuem uma taxonomia numérica (Castro et al, 2011).

A atividade catalítica das MMPs é regulada em vários níveis: transcrição, secreção, ativação e inibição. A indução da expressão dos genes das MMPs é mediada por várias citocinas inflamatórias, hormônios e fatores de crescimento

(Fanjul-Fernández et al, 2010). Essas endopeptidases são secretadas no espaço extracelular em uma forma latente (zimogênio) e devem ser clivadas por outras proteases ou MMPs para se tornarem ativas. Alguns ativadores fisiológicos incluem plasmina, ativador tecidual de plasminogênio (t-PA), ativador de plasminogênio tipo uroquinase (uPA), oxidantes e dissulfetos. Agentes não fisiológicos (compostos alquilantes e íons de metais pesados) através de alteração da interação zinco-cisteína ou perturbações alostéricas do zimogênio por autólise também podem ativar as MMPs. A inibição é mediada por quatro inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMP) (Morancho et al, 2010). Existem também inibidores artificiais de MMPs, sendo os mais conhecidos os antibióticos da classe das tetraciclinas (Liu et al, 2006).

As MMPs, através de processos proteolíticos, promovem o remodelamento da matriz extracelular (MEC), importante em processos fisiológicos e patológicos. Essas endopeptidases facilitam a migração celular, regulam a arquitetura tecidual, modulam a atividade de moléculas de sinalização e ativam citocinas, quimiocinas, fatores pró-angiogênicos (VEGF, TGF- $\beta$ ), receptores de superfície celular, fatores de crescimento e outras proteases. As MMPs contribuem, portanto, para os processos de proliferação, diferenciação, adesão, migração e apoptose celular (Dejonckheere et al, 2011).

Embora outras MMPs possam ser relevantes, as gelatinases MMP-2 e a MMP-9 têm sido fortemente implicadas na patofisiologia das doenças cardiovasculares, incluindo aterosclerose, hipertensão, insuficiência cardíaca e doença cardíaca isquêmica (Fanjul-Fernández et al, 2010 ; Fontana et al, 2012). As gelatinases degradam vários substratos: colágeno desnaturado (gelatina), elastina,

fibronectina, laminina, proteoglicanas e colágeno tipo IV, o maior componente da membrana basal (Fontana et al, 2012).

MMP-2 e MMP-9 parecem desempenhar importante papel na regulação da migração e proliferação de células do músculo liso vascular na lesão aterosclerótica através da sua ação sobre componentes da membrana basal responsáveis por modular a comunicação célula-célula (Kai et al, 1998).

Além da sua ação na matriz extracelular, a MMP-2 tem importante função intracelular. A MMP-2 é uma proteína constitutiva, expressa em cardiomiócitos normais, fibroblastos, células do músculo liso vascular e endotélio de artérias e veias normais. A MMP-9 está normalmente associada com células inflamatórias ativadas como leucócitos e macrófagos (Castro et al, 2011)

Alguns estudos demonstram associação entre níveis elevados de MMP-9, remodelamento ventricular esquerdo após infarto do miocárdio (Kelly et al, 2007) e aneurisma de aorta abdominal (Takagi et al, 2009). Aumento de MMP-2 tem sido observado em pacientes com insuficiência cardíaca congestiva (Yamazaki et al, 2004) e disfunção do miocárdio por ação em proteínas do citoesqueleto (Sung et al, 2007). Gresele et al (2011) também observaram aumento na liberação intracoronariana de MMP-2 e MMP-9 em pacientes com síndrome coronariana aguda.

Altos níveis de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$  e IL-1b) produzidas pelo acúmulo de células inflamatórias durante processos isquêmicos, induzem a expressão transcricional e ativação pós-translacional das MMPs (Dejonckheere et al, 2011). As MMP-2 e MMP-9 possuem distintos elementos promotores e padrão de expressão durante a doença isquêmica (Fanjul-Fernandez et al, 2010).

Outros fatores de risco cardiovascular como fumo, diabetes, aumento de lipídios (especialmente LDL oxidada) aumentam a expressão e ativação das MMPs (Liu et al, 2006).

As MMPs podem prejudicar os mecanismos de reparo do dano ao DNA induzido por estresse oxidativo através da clivagem de poli (ADP-ribose) polimerase (PARP) em cultura de cardiomiócitos (Yang et al, 2010).

Têm sido identificados polimorfismos que afetam a região promotora dos genes das MMPs, influenciando a eficiência da transcrição (Spinale, 2007). O alelo T do gene MMP-9 apresenta maior atividade do gene promotor e tem sido relacionado ao aumento dos níveis plasmáticos de MMP-9 e a maior mortalidade cardíaca (Mizon-Gérard et al, 2004). Alta frequência do alelo T do gene da MMP-9 tem sido observada em pacientes com THB (Rybakowski et al, 2009).

Mecanismos epigenéticos podem contribuir na regulação das MMPs. Hipometilação do promotor da MMP-9 tem sido associada ao aumento dos níveis de mRNA da MMP9 (Yan e Boyd, 2007).

## **2. OBJETIVO GERAL**

Avaliar biomarcadores de risco cardiovascular em pacientes com transtorno de humor bipolar em dois momentos: durante um episódio maníaco e após a remissão dos sintomas e comparar estes resultados com controles saudáveis

### **2.1. Objetivos específicos**

- 1) Verificar os níveis séricos de homocisteína, folato e vitamina B12, em pacientes bipolares em episódio maníaco e após a eutimia e comparar com indivíduos controles.
- 2) Avaliar marcadores inflamatórios, como proteína c-reativa e ferritina em soro de pacientes bipolares em episódio maníaco e após a eutimia e comparar com indivíduos controles.
- 3) Verificar os níveis séricos de creatina kinase, um indicador de dano cardíaco, em pacientes bipolares em episódio maníaco e após a eutimia e comparar com indivíduos controles.
- 4) Caracterizar a expressão das metaloproteinases de matriz extracelular, MMP-2 e MMP-9, em sangue total de pacientes bipolares em episódio maníaco e após a eutimia e comparar com indivíduos controles.

## PARTE II

### 3. RESULTADOS

Os objetivos dessa tese foram compilados em 2 capítulos

Capítulo I. **Homocysteine and other markers of cardiovascular risk during a manic episode in patients with Bipolar Disorder.** Fábria Chiarani, Juliana Fernandes Tramontina, Keila Maria Ceresér, Maurício Kunz, Leonardo Paim, Carmen Regla Vargas, Angela Sitta, Angela Terezinha de Souza Wyse, Sérgio Pinto Machado<sup>5</sup> Flávio Pereira Kapczinski. Artigo aceito para publicação na **Revista Brasileira de Psiquiatria.**

Referente aos objetivos 1, 2 e 3

Capítulo II. **Expression of Matrix Metalloproteinases in Patients with Bipolar Disorder.** Fábria Chiarani, Gabriel Rodrigo Fries, Laura Stertz, Keila Maria Ceresér, Maurício Kunz, Angela Terezinha de Souza Wyse, Flávio Pereira Kapczinski. Artigo submetido para publicação na **Revista Cardiovascular Toxicology.**

Referente ao objetivo 4

### **3.1. Capítulo I**

#### **Homocysteine and other markers of cardiovascular risk during a manic episode in patients with Bipolar Disorder**

#### **Homocisteína e outros marcadores de risco cardiovascular durante um episódio maníaco em pacientes com Transtorno Bipolar**

Fábria Chiarani<sup>1,2</sup>, Juliana Fernandes Tramontina<sup>1</sup>, Keila Maria Ceresér<sup>1,3</sup>, Maurício Kunz<sup>1,3</sup>, Leonardo Paim<sup>1</sup>, Carmen Regla Vargas<sup>2,4</sup>, Angela Sitta<sup>4</sup>, Angela Terezinha de Souza Wyse<sup>2</sup>, Sérgio Pinto Machado<sup>5</sup>, Flávio Pereira Kapczinski<sup>1,2,3,5</sup>.

<sup>1</sup> Molecular Psychiatry Unit and INCT Translational Medicine, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

<sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>3</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Psiquiatria, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>4</sup> Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre (RS), Brazil

<sup>5</sup> Departamento de Psiquiatria e Medicina Legal da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Corresponding author:

Fábria Chiarani

Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Laboratório de Psiquiatria Molecular – Rua Ramiro Barcelos, 2350 – Porto Alegre, RS, Brazil, CEP 90035-903, Porto Alegre, RS, Brazil.

E-mail address: [fabriachiarani@yahoo.com.br](mailto:fabriachiarani@yahoo.com.br)

## RESUMO

**Objetivo:** O transtorno de humor bipolar (THB) está associado com alto risco de morbidade e mortalidade cardiovascular. Avaliamos os níveis séricos de biomarcadores associados com doenças cardiovasculares em pacientes com THB. Cada paciente foi avaliado em dois momentos: durante um episódio maníaco e após a remissão dos sintomas. Todas as análises foram comparadas com controles saudáveis. **Métodos:** Selecionamos 30 pacientes com THB e 30 controles pareados por sexo e idade. Foram analisados os níveis de: homocisteína (Hcy), folato, vitamina B12, ferritina, creatina kinase (CK) e proteína-C-reativa (PCR). **Resultados:** Os níveis de Hcy foram significativamente maiores em pacientes comparados aos controles. Essa significância não persistiu quando estes valores foram ajustados para o índice de massa corporal (IMC). Os níveis de folato, vitamina B12, CK e PCR dos pacientes foram similares aos controles. Quando comparado os episódios de mania e eutimia nos pacientes com THB, não foram verificadas diferenças nesses parâmetros, exceto quanto aos níveis de ferritina que apresentaram-se reduzidos na mania comparado a eutimia e controles. **Conclusões:** Nossos achados não corroboram a ideia de que alterações de biomarcadores de risco cardiovascular estejam relacionadas a um episódio agudo de mania. No entanto, mais estudos são necessários para determinar prováveis fatores de risco e mecanismos associados à predisposição cardiovascular no THB.

Descritores: Homocisteína, ferritina, transtorno bipolar, doenças cardiovasculares

## ABSTRACT

**Objective:** The goal of the study was to evaluate serum levels for different biomarkers associated with cardiovascular disease in patients with bipolar disorder (BD). Patients were prospectively evaluated in two separate instances: during acute mania and after remission of manic symptoms. All measurements were compared with healthy controls. **Methods:** The study included 30 patients with BD and 30 healthy controls. Patients and controls were matched for gender and age. Biochemical parameters evaluated included homocysteine (Hcy), folic acid, vitamin B12, ferritin, creatine-kinase (CK) and C-reactive protein (CRP). **Results:** When compared to controls, Hcy levels were significantly higher in the BD patients during mania and after achieving euthymia. When Hcy was adjusted for body mass index (BMI), there was no significant difference between patients and controls. Ferritin was the only marker that showed a significant decrease during mania when compared to both euthymic patients and controls. There were no significant differences for folate, vitamin B12, CK and CRP. **Conclusions:** Our findings do not show an association between alterations of markers of cardiovascular risk during manic episodes. Further studies are necessary to determine risk factors and mechanisms associated with cardiovascular predisposition in patients with BD.

Descriptors: Homocysteine, ferritin, bipolar disorder, cardiovascular disease

## INTRODUCTION

Individuals with BD have significantly higher mortality rates than the general population.<sup>(1)</sup> Medical diseases are common in BD patients and may affect the course, severity and treatment of the disorder.<sup>(2)</sup>

Cardiovascular and cerebrovascular conditions are the leading causes of natural death among BD patients, excepting suicide or accidents.<sup>(3,1)</sup> It has been hypothesized that patients with a history of mania or hypomania may show a greater prevalence of vascular disease when compared with patients with major depression or other mental disorders.<sup>(4)</sup>

Hyperhomocysteinemia (HHcy) has been associated with increased risk of cardiovascular and cerebrovascular disease.<sup>(5)</sup> A meta-analysis of Hcy and cardiovascular disease associations showed that for every increase of 5- $\mu$ mol/L in serum Hcy concentration, the risk of ischemic heart disease increased 20.0% to 30.0%.<sup>(6)</sup> Studies also indicate that Hcy is associated with several important components of atherogenesis, including endothelial dysfunction, platelet and immune activation and inflammation.<sup>(7,8)</sup>

Determinants of HHcy, such as low concentrations of folate and vitamin B12 coenzymes, which are involved in Hcy metabolism, are also associated with increased risk of vascular damage.<sup>(9,10)</sup> It is still undetermined whether HHcy itself or low concentrations of vitamin B12 and folate are the atherogenic factors that trigger vascular disease. Individuals with low folate levels or intake have shown a higher risk of CVD; it is possible that these associations may be independent of Hcy.<sup>(11)</sup>

Studies show that the iron storage protein, ferritin, has an important enzymatic function in folate catabolism. Thus, it may be associated with higher Hcy concentrations by reducing the availability of one-carbon units for remethylation.<sup>(12)</sup>

Studies have established that depressive symptoms or episodes increase the risk for incident cardiovascular disease.<sup>(13,14)</sup> To our knowledge, there are few studies that examined the relationship between manic episodes and CVD. Results of a prospective cohort study of participants with bipolar disorder showed that (hypo) manic symptoms independently predicted cardiovascular mortality; the results also showed that mood disorders may mediate vascular disease. This mediation may occur through mechanisms that are independent of, and distinct from traditional risk factors.<sup>(15)</sup> In this same vein, one study has provided support for the notion that alterations in cardiac variability and predictability in BD may indeed be state-dependent.<sup>(16)</sup>

CK enzymes are fundamental for energy metabolism. These enzymes connect mitochondrial ATP-producing and cytosolic ATP-consuming processes. The enzymes are thus of central importance for cellular energy homeostasis.<sup>(17)</sup>

CRP is considered a marker of systemic inflammation. Prospective studies have shown a direct association between CRP levels and the risk for developing cardiovascular disease.<sup>(18,19)</sup>

The goal of the present study was to evaluate Hcy, folate vitamin B12, CRP, ferritin and CK levels within the same patient during manic state and euthymic state; these evaluations are compared with controls.

## MATERIALS AND METHODS

Patients with BD were recruited the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil. All subjects underwent a comprehensive clinical interview by a psychiatrist. The diagnosis of BD was established based on the available clinical information. In addition, diagnosis was confirmed with a Structured Clinical Interview for DSM-IV – Axis I (SCID-I) and a standard protocol to assess psychopathology and clinical features. Baseline assessment, including blood sampling, was performed at admission to the psychiatric unit. Patients had to fulfill DSM-IV criteria for manic episodes. Treatment was naturalistic and at the discretion of the attending psychiatrist. Patients did not have significant comorbid medical conditions. Mood symptoms were assessed with the Young Mania Rating Scale (YMRS)<sup>(20)</sup> and the Hamilton Depression Rating Scale (HAM-D), 21-item version.<sup>(21)</sup> All raters were trained to administer the scales; the results were assessed for inter-rater reliability. After inclusion of the patient and an initial evaluation, patients were followed up with weekly screenings until remission of manic symptoms, at which point they were reassessed and blood sampling was carried out again. Patients were considered euthymic if their score was <7 on both YMRS and HDRS scales.

Healthy controls were free of personal history of neurological or psychiatric illnesses; they had no first-degree family relationship with a patient of psychiatric disorder. Healthy controls and patients were matched for age and gender. All patients and controls gave written informed consent before entering the study. All procedures described in the study were approved by the local ethics committee.

Five milliliters of blood were withdrawn from each subject by venipuncture and stored in a free-anticoagulant vacuum tube. The blood was immediately centrifuged at 3000×g for 5 min, and serum was kept frozen at –80°C until assayed.

Hcy levels were estimated by stable isotope dilution and electrospray tandem mass spectrometry, following Magera et al (1999).<sup>(22)</sup> Hcy was detected through the transition from the precursor to the product ion (m/z 136 to m/z 90). Homocysteine-d (8) was added as internal standard. Serum reference values ranged from 5 to 15 μmol/L.

Quantitative folate and vitamin B12 serum levels were measured with a chemiluminescent immunoassay by employing the competitive test principle. Serum ferritin concentrations were determined by chemiluminescent sandwich-type immunoassay.

The measurement of CK levels was carried out using a system in which CK catalyzes the transphosphorylation reaction of ADP to ATP. ATP coupled with hexokinase-G6PD reactions produce NADPH in quantities directly proportional to the quantity of CK in the sample. The analyses were performed by monitoring the increase in absorbance of NADPH per minute at the wavelength of 340 nm.

The measurement of CRP in serum was performed using high-sensitivity C-reactive protein technique (Immunoturbidimetric Latex Assay). The purified anti-human C-reactive protein antibody, when coated in polystyrene particles and mixed with sample containing CRP results in an insoluble complex. This complex results in turbidity, which will expand with coated polystyrene particles. The turbidity is proportional to the CRP concentration in the sample.

The biochemical parameters were measured using ADVIA Centaur (Siemens Healthcare Diagnostics, Tarrytown, NY). Statistical analyses were carried out using SPSS software version 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA); results were considered significant if  $p < 0.05$  and normality was assessed using the Shapiro-Wilk test.

Comparisons between bipolar patients and between patients and controls were carried out using Generalized Estimating Equations (GEE). The GEE procedure is used for analysis of repeated measures. Cases are assumed to be dependent within subjects and independent between subjects. Gaussian distribution was evaluated for variables with symmetric profile and gamma distribution for variables with asymmetric profile. Body mass index (BMI) was included as a covariate in the regression model; results are presented with and without inclusion of BMI in the analysis. Bonferroni correction was applied for multiple comparisons.

Thirty-nine manic patients were recruited upon admission to a psychiatric inpatient unit. Nine patients were lost during follow-up due to transfer to another medical facility or due to withdrawal of the consent to participate. Only the patients who completed the follow-up until remission were included in the study. Therefore, thirty patients and thirty healthy controls (15 males and 15 females in each group) were included in the analysis. The mean age of bipolar patients was 41.15 (SD=15.83) years; and of controls, 40.84 (SD=14.95) years.

## RESULTS

The BMI of bipolar patients and controls, expressed as median (25th and 75th percentile), was 27.75 (22.41/31.82) and 26.99 (23.69/29.72), respectively. BMI was calculated as weight divided by the height squared ( $\text{Kg/m}^2$ ).

The median of the time between acute episode and remission of symptoms in bipolar patients was 29.50 (20.50/58.00) days. The median results for (IR) HAM-D and YMRS scores in the manic state were 3.50(1.75/5.00) and 27.50(19.00/30.70) and, in euthymic state, 1.00(0.00/2.50) and 1.00(0.00/4.00). Table 1 shows the evaluated parameters.

Out of the parameters evaluated, only Hcy levels were higher in bipolar patients in comparison with controls. The values did not differ within the same bipolar patient during manic and euthymic states. The difference between patient and control Hcy levels did not persist when BMI was included as a covariate.

No statistically significant differences were found in folate and vitamin B12 levels in the comparison between bipolar patients and controls. These levels persisted within bipolar patients throughout symptomatic recovery. The values of serum folate and serum vitamin B12 were within normal range.

Ferritin levels were within normal range in all subjects. However, these levels were lower in patients during mania in comparison with patients in euthymia, and in comparison with healthy controls. The result for ferritin levels persisted when BMI was included as a covariate.

CRP levels of bipolar patients were not significantly different between the manic and euthymic states. No significant differences were observed in the comparison between patients and healthy controls. CK levels were originally significantly higher in manic patients; however, the difference occurred due to a few outliers that showed elevated CK levels. The elevation in CK was probably associated with the use of intramuscular medication or with psychomotor agitation. In

the present study, we did not collect data on the frequency of use of IM medication or level of physical agitation during follow up.

## DISCUSSION

Bipolar disorder is strongly associated with changes in cardiovascular function. The etiology of excess CVD is multifactorial and it possibly includes genetic and lifestyle factors, and treatment effects.<sup>(23)</sup>

A moderately increased plasma level for Hcy and genetic factors associated with enzymatic abnormalities of folic acid and Hcy metabolism plays an important role in the development of cardiovascular disease (CVD).<sup>(24,25)</sup>

Most studies that reported higher Hcy levels in bipolar patients were carried out during euthymia and focused on functional and cognitive deterioration.<sup>(26-28)</sup> To our knowledge, this is the first study to assess Hcy levels in the same patients in both states: mania and euthymia; it is also the first study to try to relate Hcy with markers of cardiovascular disease.

Our findings show that serum Hcy levels did not change as a function of state in BD. The results also show that BMI is a determinant of Hcy levels. The significant influence of BMI in Hcy levels corroborates the results of a cohort study;<sup>(29)</sup> the results also show the importance of assessing this variable in future studies.

Median serum concentration of folate and vitamin B12 were within normal range and did not differ between patients and controls. These levels did not change between the two mood states in the same patient. CRP levels were also within normal range when compared with controls.

The finding of lower ferritin values during manic episode in comparison with euthymia and controls has not been elucidated. Ferritin decrease has been associated with other psychiatric disorders, such as attention deficit–hyperactivity, schizophrenia and major depression.<sup>(30-32)</sup> Studies have described direct pro-inflammatory effects of iron deficiency on macrophages and foam cells.<sup>(33)</sup> Other methods can be used to estimate cellular iron stores in patients. The lower levels of ferritin in the manic state may be due to limited external supply of iron and/or vitamin C. Our patients did not report having used drugs or infections that could impair the absorption of iron or be associated with blood loss.

The present study has specific limitations. The reduced sample size may have limited the statistical power necessary to show significant differences between the groups. The *p* values of CRP (0.056) do suggest, however, a tendency of finding higher levels of CRP in patients with BD in comparison with healthy controls. In the study we chose to minimize the chance of obtaining false positives by using the Bonferroni correction; this choice may increase the probability of producing false negatives. Another limitation of the study is the lack of information about other confounding variables, such as the number of previous episodes and lifestyle (eating habits and physical activity).

The influence of medication in Hcy levels is controversial. Studies have shown no significant differences in Hcy levels between patients administered lithium in comparison with those not administered lithium, neuroleptics or valproate.<sup>(34)</sup>

Given the substantial risk of cardiovascular disease, rigorous assessment of cardiovascular risk is warranted for patients with bipolar disorder. Modifiable risk factors should be treated when identified. Further research is needed to study

mechanisms by which the elevated risk for cardiovascular disease is mediated. Delivery of medical and psychiatric care should be integrated for individuals with bipolar disorder.

## ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by FIPE-HCPA (Fundo de Incentivo a Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre).

## REFERENCES

1. Osby U, Brandt L, Correia N, Ekblom A, Sørensen P. Excess mortality in bipolar and unipolar disorder in Sweden. *Arch Gen Psychiatry*. 2001;58:844–50.
2. Fagiolini A, Frank E, Scott JA, Turkin S, Kupfer DJ. Metabolic syndrome in bipolar disorder: findings from the Bipolar Disorder Center for Pennsylvanians. *Bipolar Disord*. 2005;7(5):424–30.
3. Tsai S, Lee C, Kuo C, Chen C. A retrospective analysis of risk and protective factors for natural death in bipolar disorder. *J Clin Psychiatry*. 2005;66(12):1586–91.
4. Fiedorowicz JG, He J, Merikangas KR. The association between mood and anxiety disorders with vascular diseases and risk factors in a nationally representative sample. *J Psychiatr Res*. 2011;70:145–54.
5. Veeranna V, Zalawadiya SK, Niraj A, Pradhan J, Ference B, Burack RC, Jacob S, Afonso L. Homocysteine and reclassification of cardiovascular disease risk. *J Am Coll Cardiol*. 2011;58(10):1025-33.
6. Wald DS, Law M, Morris JK. Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on causality from a meta-analysis. *BMJ*. 2002;325(7374):1202.
7. Rasouli ML, Nasir K, Blumenthal RS, Park R, Aziz DC, Budoff MJ. Plasma homocysteine predicts progression of atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2005;181:159–65.
8. Schroecksnadel K, Frick B, Winkler C, Leblhuber F, Wirleitner B, Fuchs D. Hyperhomocysteinemia and immune activation. *Clin Chem Lab Med*. 2003;41:1438–43.
9. Voutilainen S, Rissanen TH, Virtanen J, Lakka TA, Salonen JT. Low dietary folate intake is associated with an excess incidence of acute coronary events:

- the Kuopio Ischemic Heart Disease Risk Factor Study. *Circulation*. 2001;103:2674–80.
10. Durga J, Bots ML, Schouten EG, Kok FJ, Verhoef P. Low concentrations of folate, not hyperhomocysteinemia, are associated with carotid intima-media thickness. *Atherosclerosis*. 2005;179:285–92.
  11. Onat A, Hergenç G, Küçükduymaz Z, Can G, Ayhan E, Bulur S. Serum folate is associated with coronary heart disease independently of homocysteine in Turkish men. *Clin Nutr*. 2008;27(5):732-9.
  12. Suh JR, Herbig AK, Stover PJ. New perspectives on folate catabolism. *Annu Rev Nutr*. 2001;21:255–82.
  13. Rugulies, R. Depression as a predictor for coronary heart disease. A review and meta-analysis. *Am J Prev Med*. 2002;23:51–61.
  14. Ferketich A, Schwartzbaum J, Frid D, Moeschberger M. Depression as an antecedent to heart disease among women and men in the NHANES I Study. *Arch Intern Med*. 2000;160:1261–8.
  15. Fiedorowicz JG, Solomon DA, Endicott J, Leon AC, Li C, Rice JP, Coryell WH. Manic/hypomanic symptom burden and cardiovascular mortality in bipolar disorder. *Psychosom Med* 2009;71(6):598-606
  16. Henry BL, Minassian A, Paulus MP, Geyer MA, Perry W. Heart rate variability in bipolar mania and schizophrenia. *J Psychiatr Res*. 2010;44:168–76.
  17. Carvajal K, Moreno-Sanchez R. Heart metabolic disturbances in cardiovascular diseases. *Arch Med Res*. 2003;34:89–99.
  18. Cleland SJ, Sattar N, Petrie JR, Forouhi NG, Elliott HL, Connell JM. Endothelial dysfunction as a possible link between C-reactive protein levels and cardiovascular disease. *Clin Sci (Lond)*. 2000;98:531–5.

19. Sugano Y, Anzai T, Yoshikawa T, Satoh T, Iwanaga S, Hayashi T, Maekawa Y, Shimizu H, Yozu R, Ogawa S. Serum Creactive protein elevation predicts poor clinical outcome in patients with distal type acute aortic dissection: association with the occurrence of oxygenation impairment. *Int J Cardiol.* 2005;102:39–45.
20. Huang TL, Lee CT, Liu YL. Serum brain-derived neurotrophic factor levels in patients with major depression: effects of antidepressants. *J Psychiatr Res.* 2007;42:521–25.
21. Lyoo IK, Sung YH, Dager SR, Friedman SD, Lee JY, Kim SJ, Kim N, Dunner DL, Renshaw PF. Regional cerebral cortical thinning in bipolar disorder, *Bipolar Disord.* 2006;8(1):65–74.
22. Magera MJ, Lacey JM, Casetta B, Rinaldo P. Method for the Determination of Total Homocysteine in Plasma and Urine by Stable Isotope Dilution and Electrospray Tandem Mass Spectrometry. *Clin Chem.* 1999;45(9):1517-22.
23. De Hert M, Dekker JM, Wood D, Kahl KG, Holt RI, Möller HJ. Cardiovascular disease and diabetes in people with severe mental illness. Position statement from the European Psychiatric Association (EPA), supported by the European Association for the Study of Diabetes (EASD) and the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Psychiatry.* 2009;24:412-24.
24. Ebbing M, Børnaa KH, Arnesen E, Ueland PM, Nordrehaug JE, Rasmussen K, Njølstad I, Nilsen DW, Refsum H, Tverdal A, Vollset SE, Schirmer H, Bleie Ø, Steigen T, Midttun Ø, Fredriksen A, Pedersen ER, Nygård O. Combined analyses and extended follow-up of two randomized controlled homocysteine-lowering B-vitamin trials. *J Intern Med.* 2010;268(4):367-82.

25. Herrmann M, Taban-Shomal O, Ulrich Hubner U, Bohm M, Herrmann W. A review of homocysteine and heart failure. *Eur J Heart Fail.* 2006;8(6):571–6.
26. Osher Y, Sela BA, Levine J, Belmaker RH. Elevated homocysteine levels in euthymic bipolar disorder patients showing functional deterioration. *Bipolar Disord.* 2004;6(1):82-6.
27. Dittmann S, Seemüller F, Schwarz MJ, Kleindienst N, Stampfer R, Zach J, Born C, Bernhard B, Fast K, Grunze H, Engel RR, Severus E. Association of cognitive deficits with elevated homocysteine levels in euthymic bipolar patients and its impact on psychosocial functioning: preliminary results. *Bipolar Disord.* 2007;9(1-2):63-70.
28. Dias VV, Brissos S, Cardoso C, Andreazza AC, Kapczinski F. Serum homocysteine levels and cognitive functioning in euthymic bipolar patients. *J Affect Disord.* 2009;113(3):285-90.
29. Jacques PF, Bostom AG, Wilson PW, Rich S, Rosenberg IH, Selhub J. Determinants\_of\_plasma\_total\_homocysteine\_concentration in the Framingham Offspring cohort. *Am J Clin Nutr.* 2001;73(3):613-21.
30. Kuloglu M, Atmaca M, Ustündag B, Canatan H, Gecici O, Tezcan E. Serum iron levels in schizophrenic patients with or without akathisia. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2003;13(2):67-71.
31. Oner O, Alkar OU, Oner P. Relation of ferritin levels with symptom ratings and cognitive performance in children with attention deficit-hyperactivity disorder. *Pediatr Int.* 2008 Feb;50(1):40-4.
32. Baune BT, Neuhauser H, Ellert U, Berger K. The role of the inflammatory markers ferritin, transferrin and fibrinogen in the relationship between major

depression and cardiovascular disorders - The German Health Interview and Examination Survey. *Acta Psychiatr Scand.* 2010;121(2):135-42.

33. Fan Y, Wang J, Wei L, He B, Wang C, Wang B. Iron deficiency activates pro-inflammatory signaling in macrophages and foam cells via the p38 MAPK-NF- $\kappa$ B pathway. *Int J Cardiol* 2011;152(1):49-55.
34. Osher Y, Bersudsky Y, Silver H et al. Neuropsychological correlates of homocysteine levels in euthymic bipolar patients. *J Affect Disord.* 2008;105: 229–33.

Table 1: Mean and Standard Deviation (SD) of biochemical parameters

	Bipolar Patients				Controls		p	p *
	Mania		Euthymia		Mean	SD		
	Mean	SD	Mean	SD				
Homocysteine ( $\mu\text{mol/L}$ )	7.74	0.99	7.66	0.87	4.17	0.63	0.003 †	0.101
Vitamin B12 ( $\mu\text{g/ml}$ )	425.04	33.93	433.56	46.46	345.40	19.12	0.124	0.996
Folate ( $\text{ng/ml}$ )	10.81	1.11	9.50	0.60	10.36	0.95	0.334	0.622
Ferritin ( $\text{ng/ml}$ )	126.69	27.39	172.74	32.27	171.94	28.79	0.044 †	0.016 †
C-Reactive Protein ( $\text{mg/L}$ )	5.17	1.39	4.69	1.43	3.80	0.96	0.701	0.056
Creatine Kinase (U/L)	175.84	45.98	79.43	9.83	92.67	17.19	0.006 †	0.112

†  $p < 0,05$

\* adjusted by BMI (Body Mass Index)

**Decision Letter (RBP-2012-OA-0797.R1)**

**From:** jcrippa@fmrp.usp.br

**To:** fabriachiarani@yahoo.com.br

**CC:**

**Subject:** Revista Brasileira de Psiquiatria - Decision on Manuscript ID RBP-2012-OA-0797.R1

**Body:** @@date to be populated upon sending@@

Dear Miss Chiarani:

We have completed our review of your manuscript "Homocysteine and other markers of cardiovascular risk during a manic episode in patients with Bipolar Disorder" and are pleased to accept it for publication in Revista Brasileira de Psiquiatria. The comments of the reviewer(s) who reviewed your manuscript are included at the foot of this letter.

Thank you for your contribution. We look forward to your continued contributions to the Journal.

Sincerely,  
Prof. José Alexandre Crippa  
Editor, Revista Brasileira de Psiquiatria  
jcrippa@fmrp.usp.br, setroh@hotmail.com

Statistical Advisor: 1  
Comments to the Author:  
Este trabalho está adequado e deve ser aceito como está.

Editor: 2  
Comment to Author:  
(There are no comments.)

**Date Sent:** 14-May-2012

## 3.2. Capítulo II

Expression of Matrix Metalloproteinases in Patients with Bipolar Disorder

Fábria Chiarani<sup>1,2</sup>, Gabriel Rodrigo Fries<sup>1,2</sup>, Laura Stertz<sup>1,2</sup>, Keila Maria Ceresér<sup>1</sup>,  
Angela Terezinha de Souza Wyse<sup>2</sup>, Flávio Pereira Kapczinski<sup>1,2</sup>, Maurício Kunz<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Molecular Psychiatry Unit and INCT Translational Medicine, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

<sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica - Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

Corresponding author:

Fábria Chiarani

Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Laboratório de Psiquiatria Molecular – Rua Ramiro Barcelos, 2350 – Porto Alegre, RS, Brazil, CEP 90035-903, Porto Alegre, RS, Brazil.

E-mail

address:

fabriachiarani@yahoo.com.br

## ABSTRACT

**Objective:** High cardiovascular mortality has been demonstrated in bipolar disorder (BD). There is evidence indicating that matrix metalloproteinases (MMPs) are implicated in cardiovascular disease. We evaluated the expression pattern of MMP-2 and MMP-9 in blood from patients with BD during acute mania and after euthymia, in comparison with healthy controls. **Methods:** Twenty patients and twenty controls were enrolled and matched for sex and age. Messenger RNA (mRNA) levels for MMPs were measured by real-time quantitative PCR. Body mass index (BMI) was measured for all the subjects. **Results:** There were no significant differences in the mRNA expression of MMP-2 and MMP-9 in patients and controls. mRNA levels were not significantly different during mania and euthymia. However, mRNA levels for MMP2 were negatively associated with BMI in BD and positively associated with BMI in controls. There was no difference in the pattern expression of MMP-9 between patients and controls. **Conclusions:** Our results suggest a different pattern of association between MMP-2 and BMI in the BD comparing to controls. This finding may be associated with an increased activity of MMP-2, as suggested by previous studies. The role of MMPs in BD needs further investigation to better understand their relationship with cardiovascular risk.

**KEYWORDS:** bipolar disease; matrix metalloproteinases; cardiovascular disease; mania; euthymia

## INTRODUCTION

Bipolar Disorder (BD) is a mood disorder in which the patients cycles through episodes of mania and depression. Its prevalence is thought to be around 4% of the population (1). Substantial health care costs have been attributed to BD due to the high comorbidity rates associated with general medical conditions (2).

Individuals with BD are at greater risk than the general population for several medical conditions and have a life span 25 to 30 years shorter due primarily to premature cardiovascular disease (CVD) (3,4). Five-fold increased risk of CVD has been found among adults with BD versus controls (5). After suicide and accidents, cardiovascular and all vascular diseases are the leading causes of death in these patients (6).

Results of a prospective cohort study of participants with BD showed that (hypo) manic symptoms independently predicted cardiovascular mortality, and that mood disorders may mediate vascular disease through mechanisms independent of and distinct from traditional risk factors (7). Furthermore, one study provides support for the concept that alterations in cardiac variability and predictability in BD may indeed be state-dependent (8). Although evidenced by several studies, the mechanisms underlying the high cardiovascular risk in BD are not completely understood.

Matrix metalloproteinases (MMPs) are a group of endopeptidases produced by the structural components of the vascular wall and inflammatory cells, with capacity to cleave several components of the extracellular matrix (ECM). MMPs degrade a number of substrates from ECM, including denatured collagen (gelatin), elastin,

fibronectin, and collagen type IV. In addition, the MMP-2 and MMP-9 cleave different bioactive molecules, including cytokines, chemokines, cell surface receptors and growth factors (9).

The gelatinases, MMP-2 and MMP-9, are seen as significant contributors in several cardiovascular diseases, including atherosclerosis, hypertension, heart failure and ischemic heart diseases (10,11).

Pathological processes, including inflammation and oxidative or nitrosative stress, play important roles in influencing the expression, secretion, and activation of both MMPs (12). Oxidative and inflammatory pathways are suggested to be capable of explaining some of the clinical features of BD (13).

Given the importance of MMPs, especially MMP-2 and MMP-9, to cardiovascular diseases, and based on evidences that show an increased risk of cardiovascular mortality in BD, the present study aimed to evaluate the mRNA expression of MMP-2 and MMP-9 in blood of patients with BD during manic episode and after achieving euthymia, comparing them with healthy subjects.

## MATERIALS AND METHODS

Patients with BD were recruited at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, Brazil. All subjects had a comprehensive clinical interview by a psychiatrist. The diagnosis of BD was established based on all the available clinical information and confirmed with a Structured Clinical Interview for DSM-IV – Axis I (SCID-I) and a standard protocol to assess psychopathology and clinical features. Baseline assessment including blood sampling was performed at admission to the psychiatric unit. Patients had to fulfill DSM-IV criteria for a manic episode. Treatment was naturalistic at the attending psychiatrist's discretion. Patients did not have

significant comorbid medical conditions. Mood symptoms were assessed with the Young Mania Rating Scale (YMRS) (14) and the Hamilton Depression Rating Scale (HAM-D), 21-item version (15). A second assessment was done after remission of manic symptoms. Patients were considered euthymic if they scored <7 on both YMRS and HDRS scales.

Healthy controls had to be free of a personal history of neurological or psychiatric illness and had to have no first-degree relative with a psychiatric disorder. Patients and healthy controls were matched for age and gender; both were free of clinically apparent cardiovascular disease and gave written informed consent before entering the study. All procedures described in this study received approval from the local ethics committee.

#### RNA extraction and cDNA synthesis

Peripheral blood was collected from patients and healthy volunteers in PAXGene Blood RNA Tubes (PreAnalytiX) and total RNA was isolated from whole blood using PAXgene Blood RNA Kit (Qiagen), according to manufacture's instructions. RNA concentrations were assessed in the NanoDrop (Uniscience) equipment. RNA was converted to cDNA using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems), in a total reaction volume of 10 µL containing 2 µl of 10x RT buffer, 0.8 µl of 25x dNMT Mix (100 mM), 2 µl of 10x RT Random Primers and 1 µl of MultiScribe Reverse Transcriptase (50 units/ml), according to manufacture's instructions. Reactions were performed for 10 min at 25°C, 2 h at 37°C and 5 s at 85°C. Subsequently cDNA was kept at -20°C until used for PCR amplification. MMP2 and MMP9 gene expression were measured by real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) using specific

TaqMan FAM/MGB assays (Applied Biosystems, ID assay Hs01548727\_m1 for MMP2 and Hs00234579\_m1 for MMP9).

Expression values were normalized by  $\beta$ 2M endogenous control expression using a TaqMan VIC/MGB endogenous control inventoried assay (Applied Biosystems, 4326319E). Reactions were performed in ABI 7500 Real Time PCR System, which directly detects the PCR product without downstream processing. Reactions were carried out in a total volume of 12  $\mu$ l containing 6  $\mu$ l of 2x TaqMan Gene Expression Master Mix (containing ROX, Amplitaq Gold DNA polymerase, AmpErase UNG, dATP, dCTP, dGTP, dUTP, and MgCl<sub>2</sub>), 0.6  $\mu$ l of 20x TaqMan Gene Expression Assay, 0.6  $\mu$ l of 20x TaqMan Endogenous Control, 3.8  $\mu$ l of water and 1  $\mu$ l of cDNA solution. Cycling program consisted of 2 min at 50°C and 10 min at 95°C, followed by 40 cycles of 15 s at 95°C and 1 min at 60°C. All reactions were performed in triplicates. Relative expression levels were determined by the ddCt method, according to Livak and Schmittgen (16).

### Statistical analyses

Statistical analyses were performed using SPSS software version 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Significance was considered when  $P < 0.05$ . The normality tests were performed by Shapiro-Wilk. All statistical tests were performed by Generalized Estimating Equations (GEE) to compare bipolar patients with one another and with control, using Bonferroni test as a post-hoc analysis. The gamma distribution was used because the variables had asymmetric profile.

Body mass index (BMI) was included as a covariate in a regression model and results are presented with and without the influence of BMI on the analysis.

Data are presented as media and standard deviation (SD) or median and interquartile range (IR).

## RESULTS

Twenty patients and twenty healthy controls (10 males and 10 females in each group) were enrolled in the study. The mean age of bipolar patients and controls were 38.35 (SD=3.33) and 37.07 (SD=3.64) years old, respectively.

The BMI, defined as weight divided by the square of height ( $\text{Kg/m}^2$ ), of patients with BD and controls were not statistically different. Patients had a median BMI of 27.2 (19.5/58.9) and controls of 24.2 (17.1/31.6).

Median time between acute episode and symptoms remission in bipolar patients was 29.50 (20.50/58.00) days. The median of HAM-D and YMRS scores in the manic state were 3.50(1.75/5.00) and 27.50(19.00/30.70) versus 1.00(0.00/2.50) and 1.00(0.00/4.00) in euthymic state.

Table I shows the mRNA levels from bipolar patients and controls.

mRNA levels were not significantly different comparing patients with BD and controls subjects for MMP-2 or MMP-9. However, when adjusted by BMI, the expression pattern of MMP-2 was different in bipolar patients compared with controls. Negative association between BMI and mRNA levels for MMP-2 was found in our study (Figure 1). mRNA levels of both MMPs did not differ in bipolar patients between manic and euthymic state.

## DISCUSSION

Tissue remodeling and inflammation play central roles in the cardiovascular disease that change from acute events, such as myocardial infarction and sudden death, to chronic diseases, such as vascular atherosclerosis and heart failure (17). Several MMPs have been implicated in the tissue remodeling, and a critical equilibrium between MMPs and their endogenous inhibitors must exist in order to maintain the integrity of the cardiovascular system (18).

Evidences have implicated inflammatory abnormalities in BD. A number of studies have reported increased levels of inflammatory cytokines, particularly tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) may play a critical role in BD (19,20,21). A key feature of BD is shifts in mood states, and it has been suggested that immune system activation may vary across affective states (22).

To our knowledge, this is the first study reporting the expression of the MMP-2 and MMP-9 genes in total blood of patients with BD, a group at increased risk of cardiovascular disease. The finding showed that MMP-2 gene transcription changes as a function of BMI and that its expression profile is opposite when comparing patients with BD and controls in relation to the BMI.

The influence of BMI suggests that the MMP-2 expression in total blood is dependent of obesity status. These results are in agreement with the hypothesis of adipose tissue acting not only to store energy, but also as an important endocrine organ that produces and secretes a variety of inflammatory cytokines, hormones and other metabolic players involved in the pathogenesis of atherosclerosis (23).

One study found a downregulation of MMP-2 activity in premenopausal obese women, which was related with attenuated ECM degradation and thus abnormalities

of left ventricular function (24). Although MMP-2 and MMP-9 are similar enzymes, our results can corroborate with one study showing distinct promoter elements and different spatial and temporal expression patterns of these proteases during ischemia/reperfusion injury (12). It is possible that the type of upstream stimuli that are operative in BD will ultimately determine the transcriptional activity of selected MMP types.

Both nonpharmacologic and pharmacologic factors contribute to higher BMI in mental illness. In BD, atypical depression, eating habits, behavior, physical inactivity, and lowering of the basal metabolic rate during depression, can influence the BMI (25).

The different mRNA levels of MMP-2 verified may contribute to explaining a connection between BD and some somatic illnesses as cardiovascular disease.

Some potential limitations of the present study are the small number of subjects and the lack of information about lifestyle such as eating habits and physical activity practices. Our next step is to study the gene expression of major MMP-9 and MMP-2 inhibitors (TIMPs) and evaluate the MMP-9/TIMP-1 and MMP-2/TIMP-2 ratios. Furthermore, we intend to assess the circulating levels of MMP-2 and MMP-9 in these patients.

Belo et al. (26) found lower pro-MMP-2/TIMP-2 ratios in obese children and adolescents when compared to non obese controls, while that the pro-MMP-9/TIMP-1 ratios were comparable in these groups. Plasma levels and activity of MMP-2 and MMP-9 are decreased in patients with essential hypertension, which may reflect abnormal ECM metabolism. The increase of deposition of ECM components in arterial wall facilitates the vascular fibrosis (27). Derosa et al. (28) demonstrated that

both MMP-2 and MMP-9 plasma levels are significantly increased in obese patients compared to controls. Perhaps the decrease in MMP-2 mRNA in response to increase of BMI may reflect a feedback inhibition of MMP-2 transcription by the increase in circulating active MMP-2 (29).

Our study suggests a different pattern of expression of MMP-2 associated with BMI in patients with BD in comparison to healthy controls. This finding contributes to the understanding of the role of inflammation and its relationship with clinical comorbidity in BD. However, further trials are necessary to clarify the relationship between MMPs and cardiovascular risk in BD. In addition, improved therapeutic methods are needed to address the effects of obesity on individuals with this mental illness. The involvement of adipose tissue and abnormalities in the immune system appears to be a potential biological target that will likely contribute to a better understanding of the mechanisms involved in the BD pathophysiology.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by FIPE-HCPA (Fundo de Incentivo a Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre).

## REFERENCES

1. Merikangas, K.R., Jin, R., He, J.P., Kessler, R.C., Lee, S., Sampson, N.A., Viana, M.C., Andrade, L.H., Hu, C., Karam, E.G., Ladea, M., Medina-Mora, M.E., Ono, Y., Posada-Villa, J., Sagar, R., Wells, J.E., Zarkov, Z. (2011). Prevalence and correlates of bipolar spectrum disorder in the world mental health survey initiative. *Arch. Gen. Psychiatry*. 68:241-251.
2. Guo, J.J., Keck, P.E. Jr., Li, H., Jang, R., Kelton, C.M. (2008). Treatment costs and health care utilization for patients with bipolar disorder in a large managed care population. *Value. Health*. 11:416-423.
3. Colton, C.W., Manderscheid, R.W. (2006). Congruencies in increased mortality rates, years of potential life lost, and causes of death among public mental health clients in eight states. *Prev. Chronic. Dis*. 3:1–14.
4. Kupfer, D.J. (2005). The increasing medical burden in bipolar disorder. *JAMA*.293:2528–2530.
5. Goldstein, B.I., Fagiolini, A., Houck, P., Kupfer, D.J. (2009). Cardiovascular disease and hypertension among adults with bipolar I disorder in the United States. *Bipolar. Disord*.11:657-662.
6. Ösby, U., Brand, L., Correia, N., Ekblom, A., Sparén, P. (2007). Excess mortality in bipolar and unipolar disorder in Sweden. *Arch. Gen. Psychiatry*. 58:844–850.
7. Fiedorowicz, J.G., Solomon, D.A., Endicott, J., Leon, A.C., Li, C., Rice, J.P., Coryell, W.H. (2009). Manic/hypomanic symptom burden and cardiovascular mortality in bipolar disorder. *Psychosom. Med*. 71:598-606.

8. Henry, B.L., Minassian, A., Paulus, M.P., Geyer, M.A., Perry, W. (2010). Heart rate variability in bipolar mania and schizophrenia. *J. Psychiatr. Res.* 44:168–176.
9. Bäck, M., Ketelhuth, D.F.J., Agewall, S. (2010). Matrix Metalloproteinases in Atherothrombosis. *Prog. Cardiovasc. Dis.*52:410–428.
10. Castro, M.M., Kandasamy, A.D., Youssef, N., Schulz, R. (2011). Matrix metalloproteinase inhibitor properties of tetracyclines: therapeutic potential in cardiovascular diseases. *Pharmacol. Res.* 64:551-60.
11. Fontana, V., Silva, P.S., Gerlach, R.F., Tanus-Santos, J.E. (2012). Circulating matrix metalloproteinases and their inhibitors in hypertension. *Clin. Chim. Acta.* 413:656-662.
12. Dejonckheere, E., Vandenbroucke, R.E., Libert, C. (2011). Matrix metalloproteinases as drug targets in ischemia/reperfusion injury. *Drug. Discov. Today.* 16:762-778.
13. Berk, M., Kapczinski, F., Andreazza, A.C., Dean, O.M., Giorlando, F., Maes, M., Yücel, M., Gama, C.S., Dodd, S., Dean, B., Magalhães, P.V., Amminger, P., McGorry, P., Malhi, G.S. (2011). Pathways underlying neuroprogression in bipolar disorder: focus on inflammation, oxidative stress and neurotrophic factors. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 35:804-817.
14. Huang, T.L., Lee, C.T., Liu, Y.L. (2007). Serum brain-derived neurotrophic factor levels in patients with major depression: effects of antidepressants. *J. Psychiatr. Res.* 42:521–525.
15. Lyoo, I.K., Sung, Y.H., Dager, S.R., Friedman, S.D., Lee, J.Y., Kim, S.J., Kim, N., Dunner, D.L., Renshaw, P.F. (2006). Regional cerebral cortical thinning in bipolar disorder. *Bipolar. Disord.* 8:65–74.

16. Livak, K.L., Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 25:402-408.
17. Liu, P., Sun, M., Sader, S. (2006). Matrix metalloproteinases in cardiovascular disease. *Can. J. Cardiol.* 22:25-30.
18. Beaudoux, J.L., Giral, P., Bruckert, E., Foglietti, M.J., Chapman, M.J. (2004). Matrix metalloproteinases, inflammation and atherosclerosis: therapeutic perspectives. *Clin. Chem. Lab. Med.* 42:121-131.
19. Brietzke, E., Kapczinski, F. (2008). TNF- $\alpha$  as a molecular target in bipolar disorder. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 32:1355-1361.
20. Drexhage, R.C., Knijff, E.M., Padmos, R.C., Heul-Nieuwenhuijzen, L., Beumer, W., Versnel, M.A., Drexhage, H.A. (2010). The mononuclear phagocyte system and its cytokine inflammatory networks in schizophrenia and bipolar disorder. *Expert. Rev. Neurother.* 10:59-76.
21. Kapczinski, F., Dal-Pizzol, F., Teixeira, A.L., Magalhaes, P.V., Kauer-Sant'Anna, M., Klamt, F., Moreira, J.C., de Bittencourt Pasquali, M.A., Fries, G.R., Quevedo, J., Gama, C.S., Post, R. (2011). Peripheral biomarkers and illness activity in bipolar disorder. *J. Psychiatr. Res.* 45:156-161.
22. Brietzke, E., Stertz, L., Fernandes, B.S., Kauer-Sant'anna, M., Mascarenhas, M., Escosteguy Vargas, A., Chies, J.A., Kapczinski, F. (2009). Comparison of cytokine levels in depressed, manic and euthymic patients with bipolar disorder. *J. Affect. Disord.* 116:214-217.

23. Hajer, G.R., van Haeften, T.W., Visseren, F.L. (2008). Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. *Eur. Heart. J.* 29:2959–2971.
24. Kosmala, W., Plaksej, R., Przewlocka-Kosmala, M., Kuliczowska-Plaksej, J., Bednarek-Tupikowska, G., Mazurek, W. (2008). Matrix metalloproteinases 2 and 9 and their tissue inhibitors 1 and 2 in premenopausal obese women: relationship to cardiac function. *Int. J. Obes. (Lond)* 32:763-771.
25. Megna, J.L., Schwartz, T.L., Siddiqui, U.A., Herrera Rojas, M. (2011). Obesity in adults with serious and persistent mental illness: a review of postulated mechanisms and current interventions. *Ann. Clin. Psychiatry.* 23:131-140.
26. Belo, V.A., Souza-Costa, D.C., Lana, C.M., Caputo, F.L., Marcaccini, A.M., Gerlach, R.F., Bastos, M.G., Tanus-Santos, J.E. (2009). Assessment of matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-8, MMP-9, and their inhibitors, the tissue inhibitors of metalloproteinase (TIMP)-1 and TIMP-2 in obese children and adolescents. *Clin. Biochem.* 42:984-990.
27. Zervoudaki, A., Economou, E., Pitsavos, C., Vasiliadou, K., Aggeli, C., Tsioufis, K., Toutouza, M., Stefanadis, C., Toutouzas, P. (2004). The effect of Ca<sup>2+</sup> channel antagonists on plasma concentrations of matrix metalloproteinase-2 and -9 in essential hypertension. *Am. J. Hypertens.* 17:273-276.
28. Derosa, G., Ferrari, I., D'Angelo, A., Tinelli, C., Salvadeo, S.A., Ciccarelli, L., Piccinni, M.N., Gravina, A., Ramondetti, F., Maffioli, P., Cicero, A.F.

(2008). Matrix Metalloproteinase-2 and -9 Levels in Obese Patients. *Endothelium*. 15:219-224.

29. Sternlicht, M.D., Werb, Z. (2001). How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 17:463–516.

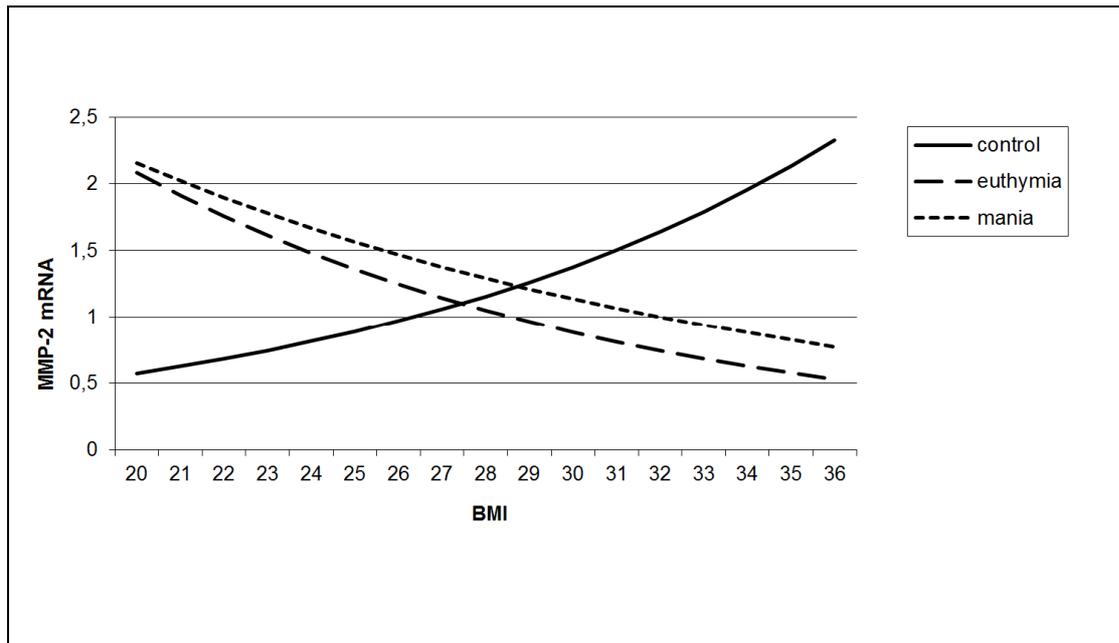
**Table I. Experimental data of mRNA levels from bipolar patients and controls.**

	<b>Bipolar Patients</b>		<b>Controls</b>	p	p <sup>a</sup>
	Mania	Euthymia			
MMP-2	1.183±0.410	1.000±0.367	1.026±0.218	0.933	0.004 <sup>b</sup>
MMP-9	0.879±0.232	0.817±0.267	1.399±0.302	0.268	0.526

Results are expressed as the mean ± standard deviation.

<sup>a</sup> adjusted by BMI (Body Mass Index).

<sup>b</sup> The mean difference is significant at the 0.05 level.



**Figure 1. Effect of BMI on MMP-2 expression in patients with BP (during mania and euthymia) and controls.**

## PARTE III

### 4. SUMÁRIO DOS RESULTADOS

- Níveis aumentados de homocisteína nos pacientes com transtorno de humor bipolar comparado aos controles saudáveis. Perda de significância estatística com a inclusão do IMC como uma covariável.
- Níveis de homocisteína semelhantes em um mesmo paciente com THB durante a mania e após a remissão dos sintomas maníacos.
- Níveis séricos de folato, vitamina B12, creatina kinase e proteína c-reativa inalterados quando comparados os pacientes bipolares nos dois estados de humor e com indivíduos controles.
- Redução dos níveis de ferritina nos pacientes bipolares em episódio maníaco em relação ao estado eutímico e aos controles.
- Níveis de mRNA da MMP-2 negativamente relacionados ao IMC nos pacientes com THB enquanto que os controles saudáveis apresentaram uma correlação positiva entre os níveis de mRNA da MMP-2 e IMC.
- Os níveis de mRNA das MMPs não diferiu no mesmo paciente entre o estado maníaco e eutímico

## 5. DISCUSSÃO

A manutenção da saúde física dos pacientes com doenças mentais graves é de grande importância. A expectativa de vida desses pacientes é em média 13,5 a 32,2 anos inferior à da população geral. Os fatores de risco cardiovascular são de particular significância nos índices de morbidade e mortalidade de pacientes psiquiátricos (Chacón et al, 2011).

A taxa de mortalidade por doenças cardiovasculares em paciente com THB é estimada em 1,9 e a taxa de prevalência de síndrome metabólica, a qual inclui muitos dos fatores de risco cardiovasculares tradicionais, é de 1,6 (Murray et al, 2009). Um estudo longitudinal realizado entre 2002 e 2006 verificou elevado risco de readmissão hospitalar por eventos cardiovasculares em pacientes com THB (Callaghan e Khizar, 2010).

Os mecanismos que promovem elevado risco cardiovascular em pacientes com THB parecem envolver questões relacionadas ao comportamento, tratamento, acesso a cuidados médicos, fatores genéticos, além dos aspectos patofisiológicos da doença (Weiner et al, 2011).

De acordo com o Diagnostic and Statistical Manual-IV (DSM-IV), o THB pode ser subdividido em duas entidades diagnósticas: THB tipo I e THB tipo II. A principal diferença diagnóstica é a severidade da elevação do humor. O THB I envolve episódios maníacos mais graves, maior número de episódios psicóticos e maior comprometimento funcional (APA, 2000).

Estudos mostram que indivíduos com THBI apresentam maior risco de mortalidade cardiovascular que os indivíduos com THBII. Esses autores sugerem que a mania, diretamente (através de fatores intrínsecos da doença) ou

indiretamente (através de variáveis associadas à doença) pode predispor à doença cardiovascular (Angst et al, 2002; Fiedorowicz et al, 2009).

A proposta dessa tese foi avaliar se pacientes com THB apresentavam alterações de marcadores de risco cardiovascular em relação aos indivíduos saudáveis e verificar se, no mesmo paciente com THB, havia variação desses marcadores durante os estados de mania e após a eutímia. Pacientes e controles foram pareados por sexo e idade e não apresentavam histórico de DCV de acordo com a avaliação dos prontuários e auto-relato. Conforme os resultados das escalas de depressão (HAM-D) e mania (YMRS) aplicadas e pela gravidade do episódio, nossos pacientes são classificados como THBI.

Resultados diferentes foram encontrados com e sem a inclusão do IMC como covariável, o que demonstra a importância desse parâmetro na análise dos estudos.

Os medicamentos utilizados no tratamento do THB têm sido associados principalmente ao ganho de peso (Newcomer, 2005; Fiedorowicz et al, 2009). 50% dos pacientes admitidos no nosso estudo utilizavam ao menos um estabilizador de humor (lítio, ácido valpróico) associado a um antipsicótico de primeira geração (haloperidol e clorpromazina) enquanto que os outros 50%, utilizavam ao menos um estabilizador de humor associado a um antipsicótico atípico (risperidona, olanzapina, clozapina). No nosso estudo, a interferência dos medicamentos é um fator de difícil controle já que se trata de um estudo antes e depois. Além disso, eticamente, não podemos interferir ou comprometer o tratamento do paciente.

No primeiro capítulo da tese, avaliamos os níveis de homocisteína, folato, vitamina B12, ferritina, PCR e creatina kinase em pacientes com THB durante o estado maníaco e após a eutímia e comparamos com controles saudáveis.

O papel da homocisteína como preditor de doença vascular aterotrombótica tem sido avaliada em vários estudos, através de mecanismos multifatoriais que incluem estresse oxidativo e ativação de células inflamatórias, células do músculo liso vascular, células endoteliais e proteases (Lee et al, 2012). Apesar disso, no nosso estudo, os níveis de homocisteína não se mostraram alterados nos pacientes com THB em relação aos controles quando os dados foram ajustados para o IMC. Os níveis séricos de folato e vitamina B12 não foram diferentes quando comparados os estados de mania e eutimia ou os pacientes com os indivíduos saudáveis. Os resultados dessas dosagens são compatíveis com os valores normais de referência.

Um artigo de revisão publicado em 2006 verificou que os estudos prospectivos de homocisteína e doença vascular (determinação da hcy antes do início da doença vascular) reportam uma associação mais fraca da homocisteína com risco cardiovascular em relação aos estudos retrospectivos (determinação da hcy após o início da doença vascular). A discrepância entre estes resultados de estudos prospectivos e retrospectivos foi interpretada como indicativo de causalidade reversa, ou seja, efeito da doença vascular sobre a concentração da homocisteína (Kaul et al, 2006). Outra revisão publicada em 2011 também refuta a relação de causalidade da homocisteína em relação à DCV. Nesta revisão foram incluídos 35.603 participantes e se observou que a redução dos níveis de homocisteína por um período de 5 anos, através da suplementação com vitamina B, não mostrou efeito benéfico em relação à doença cardíaca coronariana e acidente vascular encefálico (Clarke et al, 2011).

Uma metanálise mostra que quando ajustada para fatores de risco cardiovasculares tradicionais, a associação da homocisteína com doença cardíaca isquêmica foi atenuada de 49% para 12% (Homocysteine Studies Collaboration

2002). Nossos resultados corroboram com estes estudos, mostrando que o efeito da homocisteína nos pacientes com THB perde a significância após ajuste para o IMC, sugerindo que esse aminoácido não esteja envolvido na etiologia das doenças cardiovasculares em pacientes com THB. Considerando que a aterosclerose é de particular importância no que se refere a eventos cardiovasculares e que seu desenvolvimento é um processo lento (Smulders e Blom, 2011), a contribuição da homocisteína no processo aterosclerótico pode estar comprometida pelo tempo reduzido de seguimento dos nossos pacientes. Além disso, de acordo com Kerin et al (2001), a determinação da SAH plasmática parece ser um indicador mais sensível que Hcy plasmática total em estudos de doenças vasculares.

Células imunes, inflamatórias, endoteliais e células do músculo liso vascular estão envolvidas no processo de aterosclerose. Além da estenose causada pela lesão aterosclerótica, a ativação plaquetária, ruptura da placa e erosão endotelial levam a formação de trombos o que representa uma das principais causas de eventos cardiovasculares (Hansson, 2005).

A PCR é produzida pelo hepatócito e é comumente usada como um marcador não específico de condições inflamatórias. Níveis aumentados de PCR têm sido utilizados como indicador de doença cardiovascular estabelecida e também como um preditor de futuros eventos vasculares. Além da sua importância como indicador, a PCR tem demonstrado uma relação causal nas DCVs agindo como um iniciador de inflamação e trombose (Bisoendial et al, 2009).

Algumas evidências apontam um aumento dos níveis de PCR em pacientes com THB durante episódios maníacos comparado a pacientes sem sintomas maníacos ou sem sintomas psiquiátricos (Huang e Lin, 2007 e Dickerson et al,

2007). Entretanto, Wade et al. (2002) não observaram diferença significativa na PCR entre pacientes maníacos e controles, confirmando nossos resultados.

Nossos achados não excluem a possibilidade de que alterações em outros parâmetros inflamatórios possam estar envolvidas no desenvolvimento de doenças cardiovasculares nos pacientes com THB. Conforme descrito por Gabay e Kushner (1999), os componentes da resposta inflamatória são individualmente regulados em parte, pelo padrão de produção de citocinas específicas e seus moduladores em diferentes estados patológicos. As células são expostas a várias citocinas e a combinação delas pode gerar um efeito aditivo, inibitório ou sinérgico. Além disso, a expressão de genes de proteínas de fase aguda pode ser regulada a nível transcricional e pós-transcricional.

O THB é acompanhado de moderado aumento nos níveis de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ . Esses níveis se alteram durante os estados sintomáticos (mania e depressão) e assintomáticos (eutimia) da doença (Goldstein et al, 2009; Kim et al, 2007). O impacto nas citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias também tem sido relacionado ao estágio da doença (Berk et al, 2007a). O estado inflamatório parece mais perturbado nos estágios mais avançados da doença (Kauer Sant'Anna et al., 2009).

Essas alterações em relação aos níveis das citocinas poderiam explicar os níveis contraditórios de PCR. Considerações devem ser feitas no que se refere ao tempo de doença, número de episódios agudos prévios, recorrência e duração dos episódios e uso de medicamentos.

Pesquisas têm sido desenvolvidas para avaliar a associação da ferritina com o risco de doenças cardiovasculares, porém os resultados são bastante contraditórios (You e Wang, 2005). Níveis aumentados de ferritina têm sido

relacionados à doença arterial coronariana, infarto do miocárdio e aterosclerose de carótida (You et al, 2003; de Godoy et al, 2007; Wolff et al, 2004). Outros estudos, entretanto reportam pouca ou nenhuma evidência dessa associação (Mänttari et al, 1994; Knuiman et al, 2003). Um estudo recente mostrou que a redução dos níveis de ferritina em pacientes com síndrome coronariana aguda é capaz de predizer eventos cardiovasculares adversos (Dominguez-Rodriguez et al, 2011). Esse estudo corrobora com Fan et al. (2011) que observaram que a deficiência de ferro exerce efeito pró-inflamatório em macrófagos e células espumosas. Através da ativação da via p38 MAPK, a deficiência de ferro promoveu um aumento na produção e atividade da MMP-9. Essa via tem função importante na desestabilização do ateroma e produção de fatores inflamatórios (Fan et al, 2011).

Baune et al (2010) detectou um padrão oposto nos níveis de ferritina em relação a depressão e doenças cardiovasculares. Depressão foi relacionada a baixos níveis de ferritina enquanto que DCVs foram associadas com altos níveis de ferritina. Em uma situação de comorbidade, quando as duas condições estavam presentes, também foram observados menores níveis de ferritina.

Além da relação da ferritina com doenças cardiovasculares, estudos têm sido direcionados para a influência da ferritina nas manifestações comportamentais. Em crianças e adolescentes com déficit de atenção e hiperatividade, menores níveis de ferritina foram relacionados a maiores scores de hiperatividade (Oner et al, 2008). Esses achados foram atribuídos a uma provável hipofunção dopaminérgica, uma vez que o ferro está envolvido no metabolismo da dopamina.

Nossos resultados mostraram menores níveis de ferritina nos paciente com THB em episódio maníaco comparado ao episódio eufímico e aos controles

saudáveis. Esses resultados precisam ser investigados para verificar os efeitos da redução da ferritina sobre os sistemas inflamatório e/ou dopaminérgico.

No segundo capítulo da tese nós investigamos a expressão das MMPs 2 e 9 em pacientes com THB durante um episódio de mania e após remissão dos sintomas e comparamos com controles saudáveis.

As MMPs são produzidas por componentes estruturais, como endotélio e células do músculo liso, por células inflamatórias e plaquetas (Busti et al, 2010). As MMPs possuem a capacidade de clivar vários componentes estruturais da matriz extracelular, em particular o colágeno. Juntamente com o remodelamento da matriz extracelular, as MMPs liberam moléculas de sinalização ligadas à matriz extracelular e também diretamente ativam citocina, quimiocinas, receptores de superfície celular, fatores de crescimento e outras proteases (Dejonckheere et al, 2011).

Se por um lado, essas endopeptidases são importantes em muitos processos fisiológicos como reprodução, desenvolvimento, funções imunes e reparo tecidual, por outro elas parecem estar envolvidas em condições patológicas, como aterosclerose e suas manifestações clínicas isquêmicas como infarto do miocárdio e acidente vascular encefálico (Back et al, 2010). Entre as diversas famílias de MMPs, MMP-2 e MMP-9, tem demonstrado grande envolvimento em doenças cardiovasculares (Chow et al, 2007).

As MMPs são altamente reguladas para manter baixos níveis basais em condições fisiológicas normais. A regulação ocorre a nível transcricional, translacional e pós-translacional (Kandasamy et al, 2010).

Organismos superiores possuem múltiplas MMPs, cada qual com seu perfil de expressão, localização, ativação, inibição, clearance e preferência de substrato (Sternlicht e Werb, 2001).

Inibidores endógenos das MMPs (TIMPs) provêm mecanismos para prevenir a excessiva degradação da matriz extracelular. O desbalanço da relação MMP/TIMP pode levar a processos patológicos como acúmulo de matriz e fibrose ou degradação e perda da estrutura da matriz. Muitas dessas alterações estão associadas ao processo aterotrombótico (Spinale, 2007).

Considerando que os processos de remodelamento da matriz são dependentes do balanço entre MMP e TIMP, uma redução da expressão dos TIMPs, particularmente TIMP 1 e 2, pode facilitar a ação patogênica das MMP-9 e MMP-2.

As MMPs respondem a múltiplos estímulos como citocinas inflamatórias e fatores de crescimento. Fatores de transcrição, incluindo NF- $\kappa$ B e MAPK, estimulados por ligantes como IL-1 e TNF- $\alpha$ , ativam os promotores das MMPs (Fanjul-Fernández et al, 2010).

A regulação da expressão das MMPs pode contribuir para o entendimento da sua participação em processos fisiológicos e patológicos. Os promotores de todas as MMPs contêm múltiplos elementos que cooperam para induzir ou reprimir a expressão do gene. Apesar da similaridade funcional, os promotores da MMP-2 e MMP-9 são estruturalmente diferentes. Alguns dos elementos diferenciais da MMP-9 são TATA box e ativador de proteína-1 (AP-1) na região proximal ao seu promotor enquanto que a MMP-2 é principalmente controlado por GC Box (Yan e Boyd, 2007).

A estrutura do promotor das MMPs determina sua responsividade a certos tipos de estímulos e como estes estímulos são transduzidos para o núcleo. A transcrição sinal e célula-específica das MMPs é o resultado da integração de

diversas vias de sinalização através do recrutamento de múltiplos fatores de transcrição (Vincenti e Brinckerhoff, 2007). A diferença nos resultados observados no capítulo II dessa tese, em relação às MMPs 2 e 9, pode ser dependente de diferentes estímulos recebido por essas endopeptidases nos paciente com THB.

O padrão oposto de associação entre o IMC e os níveis de mRNA para MMP-2 observada nos pacientes com THB em relação aos controles, pode sugerir uma possível relação entre o THB e risco cardiovascular.

Os trabalhos relacionados ao papel das MMPs na hipertensão ainda são contraditórios (Lee e Griendling, 2008). Alguns trabalhos mostram redução nos níveis e atividade da MMP-2 e MMP-9 em pacientes hipertensos não tratados (Zervoudaki et al, 2004, Li-Saw-Hee et al, 2000). Aumento dos níveis do fator de crescimento do fibroblasto (FGF-2) tem sido sugerido contribuir para redução nos níveis de MMP resultando em aumento na deposição de colágeno na parede das artérias e hipertensão (Ergul et al, 2004). Se avaliados, seguindo a proposta desses autores, nossos resultados poderiam sugerir uma propensão ao desenvolvimento de hipertensão e conseqüentemente um maior risco de doenças cardiovasculares no THB.

Entretanto, a grande maioria das evidências demonstra uma relação positiva entre o aumento dos níveis e atividade das MMPs e doenças cardiovasculares. Além disso, estudos mostram que obesidade está associada ao aumento dos níveis plasmáticos das MMPs (Derosa et al, 2008). Dessa forma, seguindo o raciocínio de Sternlicht e Werb (2011), poderíamos pensar que a redução dos níveis de mRNA da MMP-2 em resposta ao aumento do IMC, poderia ser decorrente de uma feedback inibitório na transcrição pelo aumento dos níveis plasmáticos da MMP-2.

## 6. CONCLUSÕES

Apesar das evidências da ação da homocisteína na indução de estresse oxidativo e ativação de sistemas inflamatórios, nossos resultados não sugerem o envolvimento desse aminoácido no desenvolvimento de eventos cardiovasculares no THB.

Menores níveis séricos de ferritina foram observados nos pacientes com THB em episódio maníaco comparado ao estado eutímico ou comparado aos controles, entretanto todos os valores se mantiveram dentro dos valores normais de referência. A menor concentração de ferritina durante o episódio maníaco pode sugerir uma redução dos níveis de ferro e conseqüentemente, um comprometimento dopaminérgico ou inflamatório. A redução dos níveis de ferro pode ser decorrente de um déficit nutricional anterior à internação hospitalar.

Os parâmetros avaliados nessa tese não parecem ter utilidade como biomarcadores diferenciais de estado de humor da doença uma vez que não se observaram diferenças entre os estados maníaco e eutímico.

A análise dos nossos resultados leva em consideração o IMC dos sujeitos e confirma a influência dessa variável em muitos biomarcadores de risco cardiovascular.

Alguns estudos verificaram que elevado IMC está correlacionado a maior número de episódios maníacos e depressivos e encurtamento do tempo de recorrências dos episódios em pacientes com THB (Fagiolini et al, 2003; Kolotkin et al, 2006). Episódios de mania e depressão podem exacerbar comportamentos pouco saudáveis o que cumulativamente aumentam o risco de DCV (Kapczinski et al, 2008). O metabolismo lipídico parece ser uma área de particular importância na relação entre THB e doenças cardiovasculares.

Nossos resultados, mostrando resultados variáveis na expressão das gelatinases (MMP-2 e MMP-9) confirmam que a transcrição dos genes dessas enzimas é regulada por diferentes fatores de transcrição que por sua vez, são dependentes dos estímulos aplicados.

A diferença no perfil de expressão da MMP-2 em relação ao IMC comparando os pacientes com THB e os controles pode sugerir a participação dessas endopeptidases como mediadoras de doenças cardiovasculares no THB.

Está claro, que os mecanismos que levam ao risco cardiovascular em paciente com THB são complexos e variáveis, entretanto fica o alerta para os médicos psiquiatras monitorarem as manifestações dos fatores de risco e adequarem o tratamento visando à adesão do paciente ao tratamento associada à saúde física e mental do paciente.

## **7. CONCLUSÃO GERAL**

O primeiro capítulo apresenta um resultado negativo em relação à utilização da Hcy, creatina kinase, proteína C reativa e ferritina como preditores de risco cardiovascular em pacientes com THB. Além disso, estes parâmetros não parecem variar em função do estado de humor nos pacientes com THB. Nossos resultados não sugerem comprometimento da capacidade antioxidante decorrente de uma deficiência de folato.

O segundo capítulo demonstra uma diferença no perfil de expressão da MMP-2 em função do IMC entre pacientes com THB e controles. Este resultado pode representar um feedback inibitório na transcrição do mRNA em resposta ao aumento dos níveis plasmáticos de MMP-2.

O efeito da obesidade parece de fundamental importância na avaliação desses parâmetros e no risco cardiovascular no THB.

## 8. PERSPECTIVAS

- Estratificar os pacientes de acordo com o tempo de doença e número de episódios
- Avaliar outros parâmetros bioquímicos para verificar os níveis de ferro
- Avaliar a expressão e atividade da MMP-2 e MMP-9 em células mononucleares e plaquetas de pacientes com THB
- Verificar a expressão dos TIMPs em pacientes com THB
- Verificar razão entre as concentrações plasmáticas de MMP/TIMP nesses pacientes
- Investigar as vias de sinalização envolvidas na indução da expressão dessas endopeptidases.
- Avaliar os polimorfismos da MMP-2 e MMP-9 em paciente com THB
- Comparar o perfil de expressão e atividade das MMPs 3 grupos: pacientes com THB, pacientes com DCV e sem doença psiquiátrica e controles saudáveis.

## 9. BIBLIOGRAFIA

1. Abraham JM, Cho L. The homocysteine hypothesis: still relevant to the prevention and treatment of cardiovascular disease? *Cleve Clin J Med.* 2010;77(12):911-8.
2. Ackenheil M. Neurotransmitters and signal transduction processes in bipolar affective disorders: a synopsis. *J Affect Disord.* 2001;62(1- 2):101-11.
3. Adler CM, DelBello MP, Jarvis K, Levine A, Adams J, Strakowski SM. Voxel-Based Study of Structural Changes in First-Episode Patients with Bipolar Disorder. *Biological Psychiatry.* 2007;61(6):776-81.
4. Agoston-Coldea L, Mocan T, Gafosse M, Lupu S, Dumitrascu DL. Plasma homocysteine and the severity of heart failure in patients with previous myocardial infarction. *Cardiol J.* 2011;18(1):55-62.
5. Ågren H, Backlund L. Bipolar disorder: Balancing mood states early in course of illness effects long-term prognosis. *Physiology & Behavior.* 2007;92:199–202.
6. Alkhoury K, Parkin SM, Homer-Vanniasinkam S, Graham AM. Chronic homocysteine exposure upregulates endothelial adhesion molecules and mediates leukocyte: endothelial cell interactions under flow conditions. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2011;41(3):429-35.
7. Andreazza AC, Frey BN, Erdtmann B, Salvador M, Rombaldi F, Santin A, Gonçalves CA, Kapczinski F. DNA damage in bipolar disorder. *Psychiatry Res.* 2007;153(1):27-32.
8. Angst F, Stassen HH, Clayton PJ, Angst J. Mortality of patients with mood disorders: follow-up over 34–38 years. *J Affect Disord.* 2002;68:167–81.

9. APA - American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. 2000.
10. Ashfield-Watt PA, Moat SJ, Doshi SN, and McDowell IF. Folate, homocysteine, endothelial function and cardiovascular disease. What is the link? *Biomed Pharmacother*. 2001;55:425–33.
11. Au-Yeung KKW, Woo CWO, Sung FL, Yip JCW, Siow YL, OK. Hyperhomocysteinemia activates nuclear factor-kB in endothelial cells via oxidative stress. *Circ Res*. 2004;94:28–36.
12. Azadibakhsh N, Hosseini RS, Atabak S, Nateghiyan N, Golesan B, Rad AH. Efficacy of folate and vitamin B12 in lowering homocysteine concentrations in hemodialysis patients. *Saudi J Kidney Dis Transpl*. 2009; 20:779–88.
13. Bäck M, Ketelhuth D F J, Agewall S. Matrix Metalloproteinases in Atherothrombosis. *Progress in Cardiovascular Diseases* 52 (2010) 410–428.
14. Basu P, Qipshidze N, Tyagi S C, Sen U. Remodeling in vein expresses arterial phenotype in hyperhomocysteinemia. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol*. 2011;3(4):266-79.
15. Baune BT, Neuhauser H, Ellert U, Berger K. The role of the inflammatory markers ferritin, transferrin and fibrinogen in the relationship between major depression and cardiovascular disorders - The German Health Interview and Examination Survey. *Acta Psychiatr Scand*. 2010;121(2):135-42.
16. Berk M, Conus P, Lucas N, Hallam K, Malhi GS, Dodd S, Yatham LN, Yung A, McGorry P. Setting the stage: from prodrome to treatment resistance in bipolar disorder. *Bipolar Disord*. 2007a;9(7):671–8.

17. Berk M, Hallam KT, McGorry PD. The potential utility of a staging model as a course specifier: a bipolar disorder perspective. *J Affect Disord.* 2007b;100(1–3):279–81.
18. Berk M, Kapczinski F, Andreazza AC, Dean OM, Giorlando F, Maes M, Yücel M, Gama CS, Dodd S, Dean B, Magalhães PV, Amminger P, McGorry P, Malhi GS. Pathways underlying neuroprogression in bipolar disorder: focus on inflammation, oxidative stress and neurotrophic factors. *Neurosci Biobehav Rev.* 2011;35(3):804-17.
19. Berk M, Ng F, Dean O, Dodd S, Bush AI. Glutathione: a novel treatment target in psychiatry. *Trends Pharmacol Sci.* 2008;29(7):346-51.
20. Birkenaes AB, Opjordsmoen S, Brunborg C, Engh JA, Jonsdottir H, Ringen, PA, Simonsen C, Vaskinn A, Birkeland KI, Friis S, Sundet K, Andreassen OA. The level of cardiovascular risk factors in bipolar disorder equals that of schizophrenia: a comparative study. *J. Clin. Psychiatry.* 2007;68:917–23.
21. Bisioendial RJ, Boekholdt SM, Vergeer M, Stroes ES, Kastelein JJ. C-reactive protein is a mediator of cardiovascular disease. *Eur Heart J.* 2010;31(17):2087-91.
22. Bowden CL, Calabrese JR, McElroy SL, Gyulai L, Wassef A, Petty F, Pope HG Jr, Chou JC, Keck PE Jr, Rhodes LJ, Swann AC, Hirschfeld RM, Wozniak PJ. A randomized, placebo-controlled 12-month trial of divalproex and lithium in treatment of outpatients with bipolar I disorder. Divalproex Maintenance Study Group. *Arch Gen Psychiatry.* 2000;57:481-9.
23. Brambilla P, Harenski K, Nicoletti M, Mallinger AG, Frank E, Kupfer DJ, Keshavan MS, Soares JC. MRI study of posterior fossa structures and brain ventricles in bipolar patients. *J Psychiatr Res.* 2001;35(6):313-22.

24. Busti C, Falcinelli E, Momi S, Gresele P. Matrix metalloproteinases and peripheral arterial disease. *Intern Emerg Med*. 2010;5(1):13-25.
25. Callaghan RC, Khizar A. The incidence of cardiovascular morbidity among patients with bipolar disorder: A population-based longitudinal study in Ontario, Canada. *J Affect Disord*. 2010;122(1-2):118-23.
26. Castro MM, Kandasamy AD, Youssef N, Schulz R. Matrix metalloproteinase inhibitor properties of tetracyclines: therapeutic potential in cardiovascular diseases. *Pharmacol Res*. 2011 Dec;64(6):551-60.
27. Chacón F, Mora F, Gervás-Ríos A, Gilaberte I. Efficacy of lifestyle interventions in physical health management of patients with severe mental illness. *Ann Gen Psychiatry*. 2011;10:22.
28. Chalecka-Franaszek E, Chuang DM. Lithium activates the serine/threonine kinase Akt-1 and suppresses glutamate-induced inhibition of Akt-1 activity in neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:8745–50.
29. Cheng J, Kaplowitz N. Hyperhomocysteinemia, endoplasmic reticulum stress, and alcoholic injury. *World J Gastroenterol*. 2004;10(12):1699–708.
30. Chow AK, Cena J, Schulz R. Acute actions and novel targets of matrix metalloproteinases in the heart and vasculature. *Br J Pharmacol*. 2007;152(2):189-205.
31. Clarke R, Collins R, Lewington S, Donald A, Alftan G. Homocysteine and risk of ischemic heart disease and stroke: a meta-analysis. Homocysteine Studies Collaboration. *J Am Med Assoc*. 2002;288:2015–22.
32. Clarke R, Halsey J, Bennett D, Lewington S. Homocysteine and vascular disease: review of published results of the homocysteine-lowering trials. *J Inherit Metab Dis*. 2011;34(1):83-91.

33. Correll CU, Frederickson AM, Kane JM, Manu P. Equally increased risk for metabolic syndrome in patients with bipolar disorder and schizophrenia treated with second-generation antipsychotics. *Bipolar Disord.* 2008;10:1–10.
34. DATASUS. Ministerio da Saude. Acessado em: 18 Jan. 2012. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?idb2010/c08.def> e <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?idb2010/d13.def>
35. Dayal S, Lentz SR. AMA and Hyperhomocysteinemia. *Vasc Med.* 2005;10(1):27-33.
36. de Godoy MF, Takakura IT, Machado RD, Grassi LV, Nogueira PR. Serum ferritin and obstructive coronary artery disease: angiographic correlation. *Arq Bras. Cardiol.* 2007;88(4):430–3.
30. Dejonckheere E, Vandenbroucke RE, Libert C. Matrix metalloproteinases as drug targets in ischemia/reperfusion injury. *Drug Discov Today.* 2011;16(17-18):762-78.
31. Derosa, G., Ferrari, I., D'Angelo, A., Tinelli, C., Salvadeo, S.A., Ciccarelli, L., Piccinni, M.N., Gravina, A., Ramondetti, F., Maffioli, P., Cicero, A.F. (2008). Matrix Metalloproteinase-2 and -9 Levels in Obese Patients. *Endothelium.* 15:219-224.
37. Desai A, Lankford HA, Warren JS. Homocysteine augments cytokine-induced chemokine expression in human vascular smooth muscle cells: implications for atherogenesis. *Inflammation.* 2001;25:179–86.
38. Devaraj S, Du Clos TW, Jialal I. Binding and internalization of C-reactive protein by Fcγ receptors on human aortic endothelial cells mediates biological effects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25(7):1359-63.

39. Devaraj S, Kumaresan PR, Jialal I. Effect of C-reactive protein on chemokine expression in human aortic endothelial cells. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2004;36(3):405-10.
40. Dickerson F, Stallings C, Orioni A, Boronow J, Yolken R. Elevated serum levels of C-reactive protein are associated with mania symptoms in outpatients with bipolar disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2007;31(4):952-5.
41. Dokken B B. The Pathophysiology of Cardiovascular Disease and Diabetes: Beyond Blood Pressure and Lipids. *Diabetes Spectrum.* 2008;21(3):160-5.
42. Dominguez-Rodriguez A, Carrillo-Perez Tome M, Hernandez-Garcia C, Arroyo-Ucar E, Juarez-Prera R, Blanco-Palacios G, Abreu-Gonzalez P. Serum ferritin and acute coronary syndrome: a strong prognostic factor? *Int J Cardiol.* 2011;152(1):129-30.
43. Doshi SN, McDowell IF, Moat SJ, Payne N, Durrant HJ, Lewis MJ, and Goodfellow J. Folic acid improves endothelial function in coronary artery disease via mechanisms largely independent of homocysteine lowering. *Circulation.* 2002;105: 22–6.
44. Du J, Gray NA, Falke CA, Chen W, Yuan P, Szabo ST, Einat H, Manji HK. Modulation of synaptic plasticity by antimanic agents: the role of AMPA glutamate receptor subunit 1 synaptic expression. *J Neurosci.* 2004;24(29):6578-89.
45. Du J, Creson TK, Wu LJ, Ren M, Gray NA, Falke C, Wei Y, Wang Y, Blumenthal R, Machado-Vieira R, Yuan P, Chen G, Zhuo M, Manji HK. The role of hippocampal GluR1 and GluR2 receptors in manic-like behavior. *J Neurosci.* 2008;28(1):68-79.

46. Emilien G, Septien L, Brisard C, Corruble E, Bourin M. Bipolar disorder: how far are we from a rigorous definition and effective management? *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2007;31(5):975-96.
47. Ergul A, Portik-Dobos V, Hutchinson J, Franco J, Anstadt MP. Downregulation of vascular matrix metalloproteinase inducer and activator proteins in hypertensive patients. *Am J Hypertens*. 2004;17(9):775-82.
48. Fagiolini A, Frank E, Turkin S, Houck PR, Soreca I, Kupfer DJ. Metabolic syndrome in patients with bipolar disorder. *J. Clin. Psychiatry*. 2008;69:678–9.
49. Fagiolini A, Kupfer DJ, Houck PR, Novick DM, Frank E. Obesity as a correlate of outcome in patients with bipolar I disorder. *Am J Psychiatry*. 2003;160:112-7.
50. Fan Y, Wang J, Wei L, He B, Wang C, Wang B. Iron deficiency activates pro-inflammatory signaling in macrophages and foam cells via the p38 MAPK-NF- $\kappa$ B pathway. *Int J Cardiol*. 2011;152(1):49-55.
51. Fanjul-Fernandez, M. Folgueras AR, Cabrera S, López-Otín C. Matrix metalloproteinases: evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models. *Biochim. Biophys. Acta*. 2010;1803:3–19.
52. Fiedorowicz JG, Solomon DA, Endicott J, Leon AC, Li C, Rice JP, Coryell WH. Manic/ hypomanic symptom burden and cardiovascular mortality in bipolar disorder. *Psychosom Med*. 2009;71:598–606.
53. Finkelstein JD e Martin JJ. Homocysteine, *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2000;32(4):385–9.
54. Finkelstein JD. The metabolism of homocysteine: pathways and regulation. *Eur J Pediatr*. 1998;157(2):40–4.

55. Fontana V, Silva PS, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. Circulating matrix metalloproteinases and their inhibitors in hypertension. *Clin Chim Acta*. 2012;413(7-8):656-62.
56. Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med*. 1999;340(6):448-54.
57. Garcia-Portilla MP, Saiz PA, Benabarre A, Sierra P, Perez J, Rodriguez A, Livianos L, Torres P, Bobes J. The prevalence of metabolic syndrome in patients with bipolar disorder. *J. Affect. Disord*. 2008;106:197–201.
58. Goldstein BI, Kemp DE, Soczynska JK, McIntyre RS. Inflammation and the phenomenology, pathophysiology, comorbidity, and treatment of bipolar disorder: a systematic review of the literature. *J. Clin. Psychiatry*. 2009;70:1078–90.
59. Gresele P, Falcinelli E, Loffredo F, Cimmino G, Corazzi T, Forte L, Guglielmini G, Momi S, Golino P. Platelets release matrix metalloproteinase-2 in the coronary circulation of patients with acute coronary syndromes: possible role in sustained platelet activation. *Eur Heart J*. 2011;32(3):316-25.
60. Guo JJ, Keck PE Jr, Corey-Lisle PK, Li H, Jiang D, Jang R, L'Italien GJ. Risk of diabetes mellitus associated with atypical antipsychotic use among patients with bipolar disorder: A retrospective, population-based, case-control study. *J Clin Psychiatry*. 2006;67:1055–61.
61. Hahn CG, Friedman E. Abnormalities in protein kinase C signaling and the pathophysiology of bipolar disorder. *Bipolar Disord*. 1999;1(2):81-6.
62. Halliwell B, Gutteridge JM. Protection against oxidants in biological systems: the superoxide theory of oxygen toxicity. Free radicals in biology and medicine. *New York (NY): Oxford University Press; 1989*.

63. Handy DE, Zhang , Loscalzo J: Homocysteine downregulates cellular glutathione peroxidase (GPx1) by decreasing translation. *J Biol Chem.* 2005;280:15518-25.
64. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med.* 2005;352:1685–95.
65. Hoffman M. Hypothesis: hyperhomocysteinemia is an indicator of oxidant stress. *Med Hypotheses.* 2011;77(6):1088-93.
66. Holven KB, Aukrust P, Retterstol K, Hagve TA, Morkrid L, Ose L, Nenseter MS. Increased levels of C-reactive proteins and interleukin-6 in hyperhomocysteinemic subjects. *Scand J Clin Lab Invest.* 2006;66:45–54.
67. Homocysteine Studies Collaboration. Homocysteine and risk of ischemic heart disease and stroke: a meta-analysis. *JAMA.* 2002;288:2015–22
68. Huang TL, Lin FC. High-sensitivity C- reactive protein levels in patients with major depressive disorder and bipolar mania. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2007;31(2):370-2.
69. Iancu TC. Ultrastructural aspects of iron storage, transport and metabolism. *J Neural Transm.* 2011;118(3):329-35
70. Jakubowski H. Anti-N-homocysteinylated protein autoantibodies and cardiovascular disease. *Clin Chem Lab Med.* 2005;43:1011–4.
71. Jakubowski H. Biochemical basis of homocysteine toxicity in humans. *Mol Cell Life Sci.* 2004;61:470–87.
72. Jamaluddin MD, Chen I, Yang F, Jiang X, Jan M, Liu X, Schafer AI, Durante W, Yang X, Wang H. Homocysteine inhibits endothelial cell growth via DNA hypomethylation of the cyclin A gene. *Blood.* 2007;110(10):3648-55.

73. James SJ, Melnik S, Pogribna M, Pogribny IP, Caudill MA. Elevation in S-adenosylhomocysteine and DNA hypomethylation: potential epigenetic mechanism for homocysteine related pathology. *J Nutr.* 2002;132:2361–6.
74. Joshi R, Adhikari S, Patro BS, Chattopadhyay S, Mukherjee T. Free radical scavenging behavior of folic acid: evidence for possible antioxidant activity. *Free Radic Biol Med.* 2001;30:1390–9
75. Judd LL, Akiskal HS, Schettler PJ, Endicott J, Maser J, Solomon DA, Leon AC, Rice JA, Keller MB. The long-term natural history of the weekly symptomatic status of bipolar I disorder. *Arch Gen Psychiatry.* 2002;59(6):530-7.
76. Kai H, Ikeda H, Yasukawa H, Kai M, Seki Y, Kuwahara F, Ueno T, Sugi K, Imaizumi T. Peripheral blood levels of matrix metalloproteinases-2 and -9 are elevated in patients with acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol.* 1998;32(2):368-72.
77. Kandasamy AD, Chow AK, Ali MA, Schulz R. Matrix metalloproteinase-2 and myocardial oxidative stress injury: beyond the matrix. *Cardiovasc Res.* 2010;85(3):413-23.
78. Kapczinski F, Vieta E, Andreazza AC, Frey BN, Gomes FA, Tramontina J, Kauer-Sant'anna M, Grassi-Oliveira R, Post RM. Allostatic load in bipolar disorder: implications for pathophysiology and treatment. *Neurosci Biobehav Rev.* 2008;32(4):675-92.
79. Karras DJ, Kane DL. Serum markers in the emergency department diagnosis of acute myocardial infarction. *Emerg Med Clin North Am.* 2001;19(2):321-37.

80. Kauer Sant'Anna M, Kapczinski F, Andreazza AC, Bond DJ, Lam RW, Young LT, Yatham LN. Brain derived neurotrophic factor and inflammatory markers in patients with early-vs.late-stage bipolar disorder. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 2009;12:447–58.
81. Kaul S, Zadeh AA, Shah PK. Homocysteine hypothesis for atherothrombotic cardiovascular disease: not validated. *J Am Coll Cardiol.* 2006;48(5):914-23.
82. Kelly D, Cockerill G, Ng LL, et al. Plasma matrix metalloproteinase-9 and left ventricular remodelling after acute myocardial infarction in man: a prospective cohort study. *Eur Heart J.* 2007;28:711–8.
83. Kempton M J, Geddes JR, Ettinger U, Williams S C R, Grasby P M: Meta-analysis, database, and meta-regression of 98 structural imaging studies in bipolar disorder. *Arch Gen Psychiatry.* 2008;65:1017–32.
84. Kerins DM, Koury MJ, Capdevila A, Rana S e Wagner C. Plasma S-adenosylhomocysteine is a more sensitive indicator of cardiovascular disease than plasma homocysteine. *American Journal of Clinical Nutrition.* 2001;74(6):723–9.
85. Kerkeni M, Tnani M, Chuniaud L, Miled A, Maaroufi K, Trivin F. Comparative study on in vitro effects of homocysteine thiolactone and homocysteine on HUVEC cells: evidence for a stronger proapoptotic and proinflammatory homocysteine thiolactone. *Mol Cell Biochem.* 2006;291:119-26.
86. Kilbourne AM, Rofey DL, McCarthy JF, Post EP, Welsh D, Blow FC. Nutrition and exercise behavior among patients with bipolar disorder. *Bipolar Disord.* 2007;9:443–52.

87. Kim YK, Jung HG, Myint AM, Kim H, Park SH. Imbalance between proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in bipolar disorder. *J. Affect. Disord.* 2007;104:91–5.
88. Knuiman MW, Divitini ML, Olynyk JK, Cullen DJ, Bartholomew HC. Serum ferritin and cardiovascular disease: a 17-year follow-up study in Busselton, western Australia. *Am J Epidemiol.* 2003;158:144–9.
89. Kolotkin RL, Crosby RD, Corey-Lisle PK, Li H, Swanson JM. Performance of a weight-related measure of quality of life in a psychiatric sample. *Qual Life Res.* 2006;15:587-96.
90. Kupfer DJ. The increasing medical burden in bipolar disorder. *JAMA.* 2005;293:2528–30
91. Kupferschmidt DA, Zakzanis KK. Toward a functional neuroanatomical signature of bipolar disorder: quantitative evidence from the neuroimaging literature. *Psychiatry Res.* 2011 Aug 30;193(2):71-9.
92. Lasser K, Boyd JW, Woolhandler S, Himmelstein DU, McCormick D, Bor DH. Smoking and mental illness: A population-based prevalence study. *JAMA.* 2000;284:2606–10.
93. Lawrence de Koning AB, Werstuck GH, Zhou J e Austin RC. Hyperhomocysteinemia and its role in the development of atherosclerosis. *Clinical Biochemistry.* 2003;36(6):431–41.
94. Lee MY, Griendling KK. Redox signaling, vascular function, and hypertension. *Antioxid Redox Signal.* 2008;10(6):1045-59.
95. Lee BK, Kim Y, Kim YI. Association of serum ferritin with metabolic syndrome and diabetes mellitus in the South Korean general population according to

- the Korean National Health and Nutrition Examination Survey 2008. *Metabolism*. 2011;60(10):1416-24.
96. Lee SJ, Lee YS, Seo KW, Bae JU, Kim GH, Park SY, Kim CD. Homocysteine enhances MMP-9 production in murine macrophages via ERK and Akt signaling pathways. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2012;260(1):89-94.
97. Lentz SR, Haynes WG. Homocysteine: is it a clinically important cardiovascular risk factor? *Cleve Clin J Med*. 2004;71:729–34.
98. Li L, Hu BC, Gong SJ, Yan J. Homocysteine-induced caspase-3 activation by endoplasmic reticulum stress in endothelial progenitor cells from patients with coronary heart disease and healthy donors. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2011;75(7):1300-5.
99. Libby P, Theroux P. Pathophysiology of Coronary Artery Disease. *Circulation*. 2005;111(25):3481-8
100. Libby P. The Molecular Mechanisms of the Thrombotic Complications of Atherosclerosis. *J Intern Med*. 2008;263(5):517-27.
101. Lie DC, Colamarino SA, Song HJ, Désiré L, Mira H, Consiglio A, Lein ES, Jessberger S, Lansford H, Dearie AR, Gage FH. Wnt signalling regulates adult hippocampal neurogenesis. *Nature*. 2005;437:1370–75.
102. Lijfering WM, Veeger NJ, Brouwer JL, van der Meer J. The risk of venous and arterial thrombosis in hyperhomocysteinemic subjects may be a result of elevated factor VIII levels. *Haematologica*. 2007;92(12):1703-6.
103. Liu P, Sun M, Sader S. Matrix metalloproteinases in cardiovascular disease. *Can J Cardiol*. 2006;22:25-30.
104. Li-Saw-Hee FL, Edmunds E, Blann AD, Beevers DG, Lip G. Matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor metalloproteinase-1 levels in

- essential hypertension. Relationship to left ventricular mass and anti-hypertensive therapy. *Int J Card* 2000;75:43–7.
105. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature* 2000;407:233-41.
  106. Manji HK, Lenox RH. Ziskind-Somerfeld Research Award. Protein kinase C signaling in the brain: molecular transduction of mood stabilization in the treatment of manic-depressive illness. *Biol Psychiatry*. 1999;46:1328–51.
  107. Mantere O, Suominen K, Leppämäki S, Valtonen H, Arvilommi P, Isometsä E. The clinical characteristics of DSM-IV bipolar I and II disorders: baseline findings from the Jorvi Bipolar Study (JoBS). *Bipolar Disord*. 2004;6(5):395-405.
  108. Mänttari M, Manninen V, Huttunen JK, Palosuo T, Ehnholm C, Heinonen OP, Frick MH. Serum ferritin and ceruloplasmin as coronary risk factors. *Eur Heart J*. 1994;15:1599–603.
  109. Marken PA, Pies RW. Emerging treatments for bipolar disorder: safety and adverse effect profiles. *Ann Pharmacother*. 2006;40:276-85.
  110. Martinowich K, Schloesser RJ, Manji HK. Bipolar disorder: from genes to behavior pathways. *J Clin Invest*. 2009;119(4):726-36.
  111. McCully KS. Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am J Pathol*. 1969;56:111–28.
  112. Mendes JF, Arruda SF, Siqueira EM, Ito MK, Silva EF. Iron status and oxidative stress biomarkers in adults: a preliminary study. *Nutrition*. 2009;25(4):379-84.
  113. Mendis S; Puska P; Norrving B. Global Atlas on cardiovascular disease prevention and control. 2011, ISBN 978 92 4 156437 3

114. Merikangas KR, Jin R, He JP, Kessler RC, Lee S, Sampson NA, Viana MC, Andrade LH, Hu C, Karam EG, Ladea M, Medina-Mora ME, Ono Y, Posada-Villa J, Sagar R, Wells JE, Zarkov Z. Prevalence and Correlates of Bipolar Spectrum Disorder in the World Mental Health Survey Initiative. *Arch Gen Psychiatry*. 2011;68(3):241-51.
115. Meroño T, Rosso LG, Sorroche P, Boero L, Arbelbide J, Brites F. High risk of cardiovascular disease in iron overload patients. *Eur J Clin Invest*. 2011;41(5):479-86.
116. Messner B, Bernhard D. Cadmium and cardiovascular diseases: cell biology, pathophysiology, and epidemiological relevance. *Biometals*. 2010;23(5):811-22.
117. Mizon-Gérard F, de Groote P, Lamblin N, Hermant X, Dallongeville J, Amouyel P, Bauters C, Helbecque N. Prognostic impact of matrix metalloproteinase gene polymorphisms in patients with heart failure according to the aetiology of left ventricular systolic dysfunction. *Eur Heart J*. 2004;25(8):688-93.
118. Morancho A, Rosell A, García-Bonilla L, Montaner J. Metalloproteinase and stroke infarct size: role for anti-inflammatory treatment? *Ann. N.Y. Acad. Sci*. 2010;1207:123–33.
119. Murray DP, Weiner M, Prabhakar M, Fiedorowicz JG. Mania and mortality: why the excess cardiovascular risk in bipolar disorder? *Curr Psychiatry Rep*. 2009;11(6):475-80.
120. Napoli C. Developmental Mechanisms Involved in the Primary Prevention of Atherosclerosis and Cardiovascular Disease. *Curr Atheroscler Rep*. 2011;13:170–5.

121. Newcomer JW. Second-generation (atypical) antipsychotics and metabolic effects: a comprehensive literature review. *CNS Drugs*. 2005;19(1):1–93.
122. Ng F, Berk M, Dean O, Bush AI. Oxidative stress in psychiatric disorders: evidence base and therapeutic implications. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2008;11(6):851-76.
123. Nienhuis MB, Ottervanger JP, de Boer MJ, Dambrink JH, Hoorntje JC, Gosselink AT, Suryapranata H, van't Hof AW. Zwolle Myocardial Infarction Study Group. Prognostic importance of creatine kinase and creatine kinase-MB after primary percutaneous coronary intervention for ST-elevation myocardial infarction. *Am Heart J*. 2008;155(4):673-9.
124. Oedegaard KJ, Syrstad VE, Morken G, Akiskal HS, Fasmer OB.. A study of age at onset and affective temperaments in a Norwegian sample of patients with mood disorders. *Journal of Affective Disorders* 2009;118:229–33.
125. Olas B, Kedzierska M, Wachowicz B: Comparative studies on homocysteine and its metabolite – homocysteine thiolactone action in blood platelets in vitro. *Platelets*. 2008;19:520-7.
126. Oner O, Alkar OY, Oner P. Relation of ferritin levels with symptom ratings and cognitive performance in children with attention deficit-hyperactivity disorder. *Pediatr Int*. 2008;50(1):40-4.
127. Osby U, Brandt L, Correia N, Ekblom A, Sparen P. Excess mortality in bipolar and unipolar disorder in Sweden. *Arch Gen Psychiatry*. 2001;58:844–50.

128. Packard RRS, Libby P. Inflammation in Atherosclerosis: From Vascular Biology to Biomarker Discovery and Risk Prediction. *Clinical Chemistry*. 2008;54(1):24–38.
129. Portilla MPG, Saiz PA, Bascaran MT , Martíne S, Benabarre A, Sierra P, Torres P, Montes J M, Bousoño M, Bobes J. Cardiovascular risk in patients with bipolar disorder. *Journal of Affective Disorders*. 2009;115:302–8.
130. Post RM. Kindling and sensitization as models for affective episode recurrence, cyclicity, and tolerance phenomena. *Neurosci Biobehav Rev* 2007; 31(6): 858–73.
131. Puntmann VO, Taylor PC, Mayr M. Coupling vascular and myocardial inflammatory injury into a common phenotype of cardiovascular dysfunction: systemic inflammation and aging - a mini-review. *Gerontology*. 2011;57(4):295-303.
132. Quiroz JA, Gray NA, Kato T, Manji HK. Mitochondrially mediated plasticity in the pathophysiology and treatment of bipolar disorder. *Neuropsychopharmacology*. 2008;33:2551–65.
133. Refsum H, Helland S, Ueland PM. Radioenzymic determination of homocysteine in plasma and urine. *Clin Chem*. 1985;31:624–8.
134. Rybakowski JK, Skibinska M, Leszczynska-Rodziewicz A, Kaczmarek L, Hauser J. Matrix metalloproteinase-9 gene and bipolar mood disorder. *Neuromolecular Med*. 2009;11(2):128-32.
135. Salonen JT, Nyysönen K, Korpela H, Tuomilehto J, Seppänen R, Salonen R. High stored iron levels are associated with excess risk of myocardial infarction in eastern Finnish men. *Circulation*. 1992;86:803–11.

136. Sauls DL, Lockhart E, Warren ME, Lenkowski A, Wilhelm SE, Hoffman M: Modification of fibrinogen by homocysteine thiolactone increases resistance to fibrinolysis: a potential mechanism of the thrombotic tendency in hyperhomocysteinemia. *Biochem*. 2006;45:2480-7.
137. Savitz J, Drevets WC. Bipolar and major depressive disorder: neuroimaging the developmental-degenerative divide. *Neurosci Biobehav Rev*. 2009;33(5):699-771.
138. Savonitto S, Granger CB, Ardissino D, Gardner L, Cavallini C, Galvani M, Ottani F, White HD, Armstrong PW, Ohman EM, Pieper KS, Califf RM, Topol EJ; GUSTO-IIb Investigators. The prognostic value of creatine kinase elevations extends across the whole spectrum of acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol*. 2002;39(1):22-9.
139. Selhub J. Homocysteine metabolism. *Annu Rev Nutr*. 1999;19:217–6.
140. Sempos CT, Looker AC, Gillum RE, McGee DL, Vuong CV, Johnson CL. Serum ferritin and death from all causes and cardiovascular disease: the NHANES II Mortality Study. National Health and Nutrition Examination Study. *Ann Epidemiol*. 2000;10(7):441-8.
141. Seo H, Oh H, Park H, Park M, Jang Y, Lee M. Contribution of dietary intakes of antioxidants to homocysteine-induced low density lipoprotein (LDL) oxidation in atherosclerotic patients. *Yonsei Med J*. 2010;51(4):526-33.
142. Shiah IS, Yatham LN. Serotonin in mania and in the mechanism of action of mood stabilizers: a review of clinical studies. *Bipolar Disord*. 2000;2(2):77-92.

143. Schloesser R J, Huang J, Klein P S, Manji H K. Cellular plasticity cascades in the pathophysiology and treatment of bipolar disorder. *Neuropsychopharmacology*. 2008;33(1):110-33.
144. Simon NM, Smoller JW, McNamara KL, Maser RS, Zalta AK, Pollack MH, Nierenberg AA, Fava M, Wong KK. Telomere shortening and mood disorders: preliminary support for a chronic stress model of accelerated aging. *Biol Psychiatry*. 2006;60(5):432-5.
145. Singh U, Devaraj S, Vasquez-Vivar J, Jialal I. C-reactive protein decreases endothelial nitric oxide synthase activity via uncoupling. *J. Mol. Cell. Cardiol*. 2007;43(6):780-91.
146. Sitia S, Tomasoni L, Atzeni F, Ambrosio G, Cordiano C, Catapano A, Tramontana S, Perticone F, Naccarato P, Camici P, Picano E, Cortigiani L, Bevilacqua M, Milazzo L, Cusi D, Barlassina C, Sarzi-Puttini P, Turiel M. From endothelial dysfunction to atherosclerosis. *Autoimmun*. 2010;9(12):830-4.
147. Smulders YM, Blom HJ. The homocysteine controversy. *J Inherit Metab Dis*. 2011;34(1):93-9.
148. Sowden GL, Huffman JC. The impact of mental illness on cardiac outcomes: a review for the cardiologist. *Int J Cardiol*. 2009;132(1):30-7.
149. Spinale F. Myocardial Matrix Remodeling and the Matrix Metalloproteinases: Influence on Cardiac Form and Function. *Physiol*. 2007;87:1285–342.
150. Steed MM, Tyagi SC. Mechanisms of cardiovascular remodeling in hyperhomocysteinemia. *Antioxid Redox Signal*. 2011;15(7):1927-43.

151. Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2001;17:463-516.
152. Strakowski SM, Delbello MP, Adler CM. The functional neuroanatomy of bipolar disorder: a review of neuroimaging findings. *Mol Psychiatry.* 2005;10(1):105-16.
153. Suh JR, Oppenheim EW, Girgis S, Stover PJ. Purification and properties of a folate-catabolizing enzyme. *J Biol Chem.* 2000;275:35646–55.
154. Sullivan JL. Iron and the sex difference in heart disease risk. *Lancet.* 1981;1:1293–4.
155. Sung MM, Schulz CG, Wang W, Sawicki G, Bautista-López NL, Schulz R. Matrix metalloproteinase-2 degrades the cytoskeletal protein alpha-actinin in peroxynitrite mediated myocardial injury. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2007;43(4):429-36.
156. Takagi H, Manabe H, Kawai N, Goto SN, Umemoto T. Circulating matrix metalloproteinase-9 concentrations and abdominal aortic aneurysm presence: a meta-analysis. *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2009;9:437–40.
157. Takahashi T, Anzai T, Kaneko H, Mano Y, Anzai A, Nagai T, Kohno T, Maekawa Y, Yoshikawa T, Fukuda K, Ogawa S. Increased C-reactive protein expression exacerbates left ventricular dysfunction and remodeling after myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2010;299(6):1795-804.
158. Tehlivets O. Homocysteine as a Risk Factor for Atherosclerosis: Is Its Conversion to S-Adenosyl-L-Homocysteine the Key to Deregulated lipid Metabolism? *Journal of Lipids.* 2011;2011:1-11.

159. Tuomainen TP, Diczfalusy U, Kaikkonen J, Nyssönen K, Salonen JT. Serum ferritin concentration is associated with plasma levels of cholesterol oxidation products in man. *Free Radic. Biol. Med.* 2003;35(8):922-8.
160. Tyagi N, Ovechkin AV, Lominadze D, Moshal KS, Tyagi SC. Mitochondrial mechanism of microvascular endothelial cells apoptosis in hyperhomocysteinemia. *J Cell Biochem.* 2006;98(5):1150–62.
161. Ueland PM, Refsum H, Stabler SP, Malinow MR, Andersson A e Allen RH. Total homocysteine in plasma or serum: methods and clinical applications. *Clin Chem* 1993;39:1764–79.
162. Vincenti MP, Brinckerhoff CE, Signal transduction and cell-type specific regulation of matrix metalloproteinase gene expression: can MMPs be good for you? *J. Cell Physiol.* 2007;213:355–64.
163. Vornik LA, Brown ES. Management of comorbid bipolar disorder and substance abuse. *J Clin Psychiatry.* 2006;67(S7):24-30.
164. Wadee AA, Kuschke RH, Wood LA, Berk M, Ichim L, Maes M. Serological observations in patients suffering from acute manic episodes. *Hum Psychopharmacol.* 2002;17:175–9.
165. Wadham C, Albanese N, Roberts J, Wang L, Bagley CJ, Gamble JR, Rye KA, Barter PJ, Vadas MA, Xia P. High-density lipoproteins neutralize C-reactive protein proinflammatory activity. *Circulation.* 2004;109(17):2116-22.
166. Wald DS, Law M, Morris JK. Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on causality from a meta-analysis. *BMJ.* 2002;325(7374):1202.
167. Wang CH, Li SH, Weisel RD, Fedak PW, Dumont AS, Szmitko P, Li RK, Mickle DA, Verma S. C-reactive protein upregulates angiotensin type 1 receptors in vascular smooth muscle. *Circulation.* 2003;107(13):1783-90.

168. Wang GOK. Homocysteine stimulates the expression of monocyte chemoattractant protein-1 receptor (CCR2) in human monocytes: possible involvement of oxygen free radical. *Biochem J.* 2001;357:233–40.
169. Washio T, Nomoto K, Watanabe I, Tani S, Nagao K, Hirayama A. Relationship between plasma homocysteine levels and congestive heart failure in patients with acute myocardial infarction. Homocysteine and congestive heart failure. *Int Heart J.* 2011;52(4):224-8.
170. Watt RK. The many faces of the octahedral ferritin protein. *Biometals.* 2011;24:489–500.
171. Weiner M, Warren L, Fiedorowicz JG. Cardiovascular morbidity and mortality in bipolar disorder. *Ann Clin Psychiatry.* 2011;23(1):40-7.
172. Wolff B, Volzke H, Ludemann J, Robinson D, Vogelgesang A, Staudt A, Kessler C, Dahm JB, John U, Felix SB. Association between high serum ferritin levels and carotid atherosclerosis in the study of health in Pomerania (SHIP). *Stroke.* 2004;35:453– 7.
173. Yamazaki T, Lee JD, Shimizu H, Uzui H, Ueda T. Circulating matrix metalloproteinase-2 is elevated in patients with congestive heart failure. *Eur J Heart Fail.* 2004;6:41–5.
174. Yan C, Boyd DD. Regulation of matrix metalloproteinase gene expression. *J Cell Physiol.* 2007;211:19–26.
175. Yang Y, Candelario-Jalil E, Thompson JF, Cuadrado E, Estrada EY, Rosell A, Montaner J, Rosenberg GA. Increased intranuclear matrix metalloproteinase activity in neurons interferes with oxidative DNA repair in focal cerebral ischemia. *J. Neurochem.* 2010;112:134–49.

176. You SA, Wang Q. Ferritin in atherosclerosis. *Clin Chim Acta*. 2005;357(1):1–16.
177. You SA, Archacki SR, Angheloiu G, Moravec CS, Rao S, Kinter M, Topol EJ, Wang Q. Proteomic approach to coronary atherosclerosis shows ferritin light chain as a significant marker:evidence consistent with iron hypothesis in atherosclerosis. *Physiol Genomics*. 2003;13(1):25-30.
178. Yuan SM, Jing H, Lavee J. The implicaticons of serum enzymes and coagulation activities in postinfarction myocardial rupture. *Rev Bras Cir Cardiovasc*. 2011;26(1):7-14.
179. Zarate CA, Singh JB, Carlson PJ, Manji HK.Molecular mechanisms of bipolar disorder. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*. 2005;2(4):435-45.
180. Zeng X, Dai J, Remick DG, Wang X. Homocysteine mediated expression and secretion of monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 in human monocytes. *Circ Res*. 2003;93:311–20.
181. Zervoudaki, A., Economou, E., Pitsavos, C., Vasiliadou, K., Aggeli, C., Tsioufis, K., Toutouza, M., Stefanadis, C., Toutouzas, P. (2004). The effect of Ca<sup>2+</sup> channel antagonists on plasma concentrations of matrix metalloproteinase-2 and -9 in essential hypertension. *Am. J. Hypertens*. 17:273-276.
182. Zhang F, Phiel CJ, Spece L, Gurvich N, Klein PS. Inhibitory phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) in response to lithium. Evidence for autoregulation of GSK-3. *J. Biol. Chem*. 2003;278:33067–77.

183. Zhang X, Li H, Jin H, Ebin Z, Brodsky S, and Goligorsky MS. Effects of homocysteine on endothelial nitric oxide production. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2000;279:671–8.
184. Zheng H, Dimayuga C, Hudaihed A , Katz S D. Effect of dexrazoxane on homocysteine-induced endothelial dysfunction in normal subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22:15-8.
185. Zheng H, Huang X, Zhang Q, Katz SD. Iron sucrose augments homocysteine-induced endothelial dysfunction in normal subjects. *Kidney Int.* 2006;69:679–84.
186. Zhou J, Austin RC. Contributions of hyperhomocysteinemia to atherosclerosis: causal relationship and potential mechanisms. *BioFactors.* 2009;35(2):120-9.
187. Zhou YH, Tang JY, Wu MJ, Lu J, Wei X, Qin YY, Wang C, Xu JF, He J. Effect of folic acid supplementation on cardiovascular outcomes: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2011;6(9):25142.

## 10. ANEXO 1: LISTA DE FIGURAS

Figura 1. A patofisiologia do THB: Diferentes sistemas em diferentes níveis fisiológicos nos quais essa doença se manifesta: molecular, celular e comportamental (Schloesser et al, 2008). .....	12
Figura 2. Potenciais explicações para a associação entre o THB e doenças cardiovasculares (Murray et al, 2009). .....	14
Figura 3. Metabolismo da Homocisteína. (Hoffman, 2011). .....	17
Figura 4. Efeito molecular do estresse oxidativo mediado pela Hcy. Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio geradas pela hiperhomocisteinemia promovem dano molecular e conseqüentemente disfunção vascular (Steed et al, 2011). .....	20

## 11. ANEXO 2: TERMO DE CONSENTIMENTO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO: Paciente

Nome: \_\_\_\_\_ Data de Nascimento: \_\_\_\_\_  
Pesquisador responsável: Flávio Kapczinski  
Nome do Pesquisador: Fábria Chiarani

Antes de participar deste estudo, gostaríamos que você tomasse conhecimento do que ele envolve. Damos abaixo alguns esclarecimentos sobre dúvidas que você possa ter. Em caso de qualquer outra dúvida quanto ao estudo e o que ele envolve e sobre os seus direitos, você deverá contatar a pesquisadora Fábria Chiarani pelo telefone (051) 98721717.

Qual o objetivo desta pesquisa?

Conhecer características clínicas dos pacientes e sua possível relação com alterações bioquímicas e genéticas. Existe uma possibilidade de associação dessas alterações com o transtorno bipolar, mas mais estudos devem ser feitos para constatar tal afirmação. Ou seja, este estudo tem por objetivo, de uma forma geral, conhecer um pouco melhor como "funciona" o transtorno bipolar.

O que acontecerá neste estudo?

Após os pacientes e familiares responderem às questões em estudo através de questionários, será feita uma colheita de sangue que será utilizado apenas para observar estas alterações.

O que se espera deste estudo?

A sua participação neste estudo poderá proporcionar a identificação de algum problema não antes conhecido, poderá ajudar no desenvolvimento de maior conhecimento do transtorno bipolar principalmente em relação às causas da doença e como ela funciona.

Quais são os direitos dos participantes?

Os pesquisadores deste estudo podem precisar examinar os seus registros, a fim de verificar as informações para o objetivo deste estudo. No entanto, os seus registros médicos serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados deste estudo poderão ser enviados para publicação em um jornal científico, mas você não será identificado por nome. Sua participação no estudo é voluntária, de forma que caso você decida não participar, isto não afetará o tratamento normal ao que o paciente tem direito.

Quais são os riscos que envolvem este estudo?

Este estudo possui riscos mínimos que são inerentes do procedimento de punção venosa.

Quais são as responsabilidades dos participantes?

Os participantes deste estudo comprometem-se a responder corretamente as escalas aplicadas pelos médicos pesquisadores e as escalas auto-aplicáveis. Declaro que:

HCPA / GPTG  
VERSÃO APROVADA  
11/02/2011  
JCC/4511 TAV

Recebi uma explicação completa do objetivo do estudo, dos procedimentos envolvidos e o que se espera de minha pessoa.

Estou ciente de que tenho total liberdade de desistir do estudo a qualquer momento e que esta desistência não irá, de forma alguma, afetar meu tratamento ou administração médica futura na instituição.

Estou ciente de que a informação nos meus registros médicos é essencial para a avaliação dos resultados do estudo. Concordo em liberar esta informação sob o entendimento de que ela será tratada confidencialmente, ou seja, não serei referido por nome em qualquer relatório relacionado a este estudo. Da minha parte, não devo restringir, de forma alguma, o uso dos resultados que possam surgir deste estudo.

Concordo total e voluntariamente em fazer parte deste estudo; tenho mais de 18 anos.

Assinatura do Paciente  
Data:

Assinatura do Pesquisador  
Pesquisador: Fábria Chiarani  
Data:

Assinatura do Familiar Responsável pelo Paciente  
Data:

Se você tiver qualquer dúvida poderá telefonar para a pesquisadora Fábria Chiarani no telefone (051)98721717.

Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA)  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)  
Laboratório de Psiquiatria Molecular  
Rua Ramiro Barcelos, 2350/ Anexo, térreo  
Porto Alegre - RS, Brasil - CEP 90035-903  
+55 51 3359-8845  
+55 51 3359-8846 (fax)

HCPA / GMG  
VERSÃO APROVADA  
17/02/2011  
JCC444 TAV

## **12. ANEXO 3: ESCALA YMRS (MANIA)**

### **YMRS**

#### **Item - definição**

#### **01. HUMOR E AFETO ELEVADOS**

Este item compreende uma sensação difusa e prolongada, subjetivamente experimentada e relatada pelo indivíduo, caracterizada por sensação de bem-estar, alegria, otimismo, confiança e ânimo. Pode haver um afeto expansivo, ou seja, uma expressão dos sentimentos exagerada ou sem limites, associada à intensa relação com sentimentos de grandeza (euforia). O humor pode ou não ser congruente ao conteúdo do pensamento.

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

#### **02. ATIVIDADE MOTORA - ENERGIA AUMENTADA**

Este item compreende a psicomotricidade - e expressão corporal - apresentada pelo paciente, incluindo a sua capacidade em controlá-la, variando desde um grau de

normalidade, até um estado de agitação, com atividade motora sem finalidade, não influenciada por estímulos externos. O item compreende ainda o relato subjetivo do paciente, quanto à sensação de energia, ou seja, capacidade de produzir e agir.

(0) Ausente

(1) Relato subjetivo de aumento da energia ou atividade motora

(2) Apresenta-se animado ou com gestos aumentados

(3) Energia excessiva; às vezes hiperativo; inquieto (mas pode ser acalmado).

(4) Excitação motora; hiperatividade contínua (não pode ser acalmado).

(X) Não avaliado

### **03. INTERESSE SEXUAL**

Este item compreende idéias e/ou impulsos persistentes relacionados a questões sexuais, incluindo a capacidade do paciente em controlá-los. O interesse sexual pode restringir-se a pensamentos e desejos não concretizados, em geral verbalizados apenas após solicitação, podendo chegar até a um comportamento sexual frenético e desenfreado, sem qualquer controle ou crítica quanto a riscos e normas morais.

(0) Normal; sem aumento.

(1) Discreta ou possivelmente aumentado

(2) Descreve aumento subjetivo, quando questionado.

(3) Conteúdo sexual espontâneo; discurso centrado em questões sexuais; auto-relato de hipersexualidade.

(4) Relato confirmado ou observação direta de comportamento explicitamente sexualizado, pelo entrevistador ou outras pessoas.

(X) Não avaliado

#### **04. SONO**

Este item inclui a redução ou falta da capacidade de dormir, e/ou a redução ou falta de necessidade de dormir, para sentir-se bem-disposto e ativo.

(0) Não relata diminuição do sono

(1) Dorme menos que a quantidade normal, cerca de 1 hora a menos do que o seu habitual.

(2) Dorme menos que a quantidade normal, mais que 1 hora a menos do que o seu habitual.

(3) Relata diminuição da necessidade de sono

(4) Nega necessidade de sono

(X) Não avaliado

#### **05. IRRITABILIDADE**

Este item revela a predisposição afetiva para sentimentos/emoções como raiva ou mau-humor apresentados pelo paciente frente a

estímulos externos. Inclui baixo-limiar à frustração, com reações de ira exagerada, podendo chegar a um estado constante de comportamento desafiador, querelante e hostil.

(0) Ausente

(2) Subjetivamente aumentada

(4) Irritável em alguns momentos durante a entrevista; episódios recentes (nas últimas 24 horas) de ira ou irritação na enfermaria

(6) Irritável durante a maior parte da entrevista; ríspido e lacônico o tempo todo.

(8) Hostil; não cooperativo; entrevista impossível.

(X) Não avaliado

## **06. FALA (VELOCIDADE E QUANTIDADE)**

Este item compreende a velocidade e quantidade do discurso verbal apresentado pelo paciente. Inclui sua capacidade de percebê-lo e controlá-lo, por exemplo, frente a solicitações para que permaneça em silêncio ou permita que o entrevistador fale.

(0) Sem aumento

(2) Percebe-se mais falante do que o seu habitual

(4) Aumento da velocidade ou quantidade da fala em alguns momentos; verborréico, às vezes (com solicitação, consegue-se interromper a fala).

(6) Quantidade e velocidade constantemente aumentadas; dificuldade para ser interrompido (não atende a solicitações; fala junto com o entrevistador).

(8) Fala pressionada, ininterruptível, contínua (ignora a solicitação do entrevistador).

(X) Não avaliado

## 07. LINGUAGEM - DISTÚRBIO DO PENSAMENTO

Este item refere-se a alterações da forma do pensamento, avaliado pelas construções verbais emitidas pelo paciente. O pensamento pode estar mais ou menos desorganizado, de acordo com a gravidade das alterações formais do pensamento, descritas a seguir:

Circunstancialidade: fala indireta que demora para atingir o ponto desejado, mas eventualmente vai desde o ponto de origem até o

objetivo final, a despeito da superinclusão de detalhes;

Tangencialidade: incapacidade para manter associações do pensamento dirigidas ao objetivo - o paciente nunca chega do

ponto inicial ao objetivo final desejado;

Fuga de idéias: verbalizações rápidas e contínuas, ou jogos de palavras que produzem uma constante mudança de uma idéia para outra; as idéias tendem a estar conectadas e, mesmo em formas menos graves, podem ser difíceis de ser acompanhadas pelo

ouvinte;

Ecolalia consonante: repetição automática de palavras ou frases, com entonação e forma que produzem efeito sonoro de rima;

Incoerência: fala ou pensamento essencialmente incompreensíveis aos outros, porque as palavras ou frases são reunidas sem uma conexão com lógica e significado.

(0) Sem alterações

(1) Circunstancial; pensamentos rápidos.

(2) Perde objetivos do pensamento; muda de assuntos freqüentemente; pensamentos muito acelerados

(3) Fuga de idéias; tangencialidade; dificuldade para acompanhar o pensamento; ecolalia consonante

(4) Incoerência; comunicação impossível.

(X) Não avaliado

## **08. CONTEÚDO**

Este item compreende idéias e crenças apresentadas pelo paciente, variando, de acordo com a intensidade, de idéias novas e/ou incomuns ao paciente, ideação supervalorizada (ou seja, crença falsa, intensamente arraigada, porém susceptível à argumentação racional), a delírios (crenças falsas, baseadas em inferências incorretas sobre a realidade, inconsistentes com a inteligência e antecedentes culturais do paciente, e que não podem ser corrigidas pela argumentação). Conteúdos comumente encontrados no paciente maníaco, incluem:

Idéias místicas: de conteúdo religioso;

Idéias paranóides: crença de estar sendo molestado ou perseguido;

Idéias de grandeza: concepção exagerada da própria importância, poder ou identidade, incluindo posses materiais, qualidades

incomuns e relacionamentos especiais com personalidades famosas ou entidades místicas;

Idéias de referência: crença de que o comportamento dos outros tem relação consigo próprio ou de que eventos, objetos ou outras

pessoas possuem um significado particular e incomum para si.

(0) Normal

(2) Novos interesses e planos compatíveis com a condição sócio-cultural do paciente, mas questionáveis.

(4) Projetos especiais totalmente incompatíveis com a condição sócio-econômica do paciente; hiper-religioso.

(6) Idéias supervalorizadas

(8) Delírios

(X) Não avaliado

## **09. COMPORTAMENTO DISRUPTIVO AGRESSIVO**

Este item compreende a atitude e as respostas do paciente ao entrevistador e à situação da entrevista. O paciente pode apresentar-se desconfiado ou irônico e sarcástico, mas ainda assim respondendo aos questionamentos, ou então não cooperativo e francamente agressivo, inviabilizando a entrevista.

(0) Ausente, cooperativo.

(2) Sarcástico; barulhento, às vezes, desconfiado.

(4) Ameaça o entrevistador; gritando; entrevista dificultada.

(6) Agressivo; destrutivo; entrevista impossível.

(X) Não avaliado

## **10. APARÊNCIA**

Este item compreende a apresentação física do paciente, incluindo aspectos de higiene, asseio e modo de vestir-se.

(0) Arrumado e vestido apropriadamente

(1) Descuidado minimamente; adornos ou roupas minimamente inadequados ou exagerados.

(2) Precariamente asseado; despenteado moderadamente; vestido com exagero.

(3) Desgrenhado; vestido parcialmente; maquiagem extravagante.

(4) Completamente descuidado; com muitos adornos e adereços; roupas bizarras.

(X) Não avaliado

## **11. INSIGHT (DISCERNIMENTO)**

Este item refere-se ao grau de consciência e compreensão do paciente quanto ao fato de estar doente. Varia de um entendimento adequado (afetivo e intelectual) quanto à presença da doença, passando por concordância apenas frente à argumentação, chegando a uma negação total de sua enfermidade, referindo estar em seu comportamento normal e não necessitando de qualquer tratamento.

(0) Insight presente: espontaneamente refere estar doente e concorda com a necessidade de tratamento

(1) Insight duvidoso: com argumentação, admite possível doença e necessidade de tratamento.

(2) Insight prejudicado: espontaneamente admite alteração comportamental, mas não a relaciona com a doença, ou discorda da necessidade de tratamento.

(3) Insight ausente: com argumentação, admite de forma vaga alteração comportamental, mas não a relaciona com a doença e discorda da necessidade de tratamento.

(4) Insight ausente: nega a doença, qualquer alteração comportamental e necessidade de tratamento.

(X) Não avaliado

### **13. ANEXO 4: ESCALA HAMILTON (DEPRESSÃO)**

#### **HAMILTON DEPRESSÃO**

**Todos os itens devem ser preenchidos. Assinalar o número apropriado.**

#### **1. HUMOR DEPRIMIDO (TRISTEZA, DESESPERANÇA, DESAMPARO, INUTILIDADE)**

0. Ausente.

1. Sentimentos relatados apenas ao ser inquirido.

2. Sentimentos relatados espontaneamente com palavras.

3. Comunica os sentimentos não com palavras, isto é, com a expressão facial, a postura, a voz e a tendência ao choro.

4. Sentimentos deduzidos da comunicação verbal e não-verbal do paciente.

#### **2. SENTIMENTOS DE CULPA**

0. Ausente

1. Auto-recriminação; sente que decepcionou os outros.

2. Idéias de culpa ou ruminção sobre erros passados ou más ações.

3. A doença atual é um castigo.

4. Ouve vozes de acusação ou denúncia e/ou tem alucinações visuais ameaçadoras.

### **3. SUICÍDIO**

0. Ausente.

1. Sente que a vida não vale a pena.

2. Desejaria estar morto ou pensa na probabilidade de sua própria morte.

3. Idéias ou gestos suicidas.

4. Tentativa de suicídio ( qualquer tentativa séria, marcar 4).

### **4. INSÔNIA INICIAL**

0. Sem dificuldades para conciliar o sono.

1. Queixa-se de dificuldade ocasional para conciliar o sono, isto é, mais de meia hora.

2. Queixa-se de dificuldade para conciliar o sono todas as noites.

### **5. INSÔNIA INTERMEDIÁRIA**

0. Sem dificuldades.

1. O paciente se queixa de inquietude e perturbação durante a noite.

2. Acorda à noite - qualquer saída da cama marcar 2( exceto p/ urinar).

## **6. INSÔNIA TARDIA**

0. Sem dificuldades.

1. Acorda de madrugada, mas volta a dormir

2. Incapaz de voltar a conciliar o sono se deixar a cama.

## **7. TRABALHO E ATIVIDADES**

0. Sem dificuldades.

1. Pensamento e sentimentos de incapacidade, fadiga ou fraqueza relacionada a atividades, trabalho ou passatempos.

2. Perda de interesse por atividades (passatempos ou trabalho) quer diretamente relatada pelo paciente, quer indiretamente por desatenção, indecisão e vacilação (sente que precisa esforçar-se para o trabalho ou atividade).

3. Diminuição do tempo gasto em atividades ou queda de produtividade. No hospital, marcar 3 se o paciente não passar ao menos 3 horas por dia em atividades externas (trabalho hospitalar ou passatempo).

4. Parou de trabalhar devido à doença atual. No hospital, marcar 4 se o paciente não se ocupar com outras atividades, além de pequenas tarefas do leito, ou for incapaz de realizá-las sem ajuda.

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

0. Pensamento e fala normais.

1. Leve retardo à entrevista.

2. Retardo óbvio à entrevista.

3. Entrevista difícil.

4. Estupor completo.

**9. AGITAÇÃO**

0. Nenhuma.

1. Inquietude.

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

3. Mexe-se, não consegue sentar quieto.

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

**10. ANSIEDADE PSÍQUICA**

0. Sem dificuldade.

1. Tensão e irritabilidade subjetivas.

2. Preocupação com trivialidades.

3. Atitude apreensiva aparente no rosto ou na fala.

4. Medos expressos sem serem inquiridos.

## **11. ANSIEDADE SOMÁTICA**

Concomitantes fisiológicos de ansiedade, tais como:

Gastrointestinais: boca seca, flatulência, indigestão, diarreia, cólicas, eructação;

Cardiovasculares: palpitações, cefaléia;

Respiratórios: hiperventilação, suspiros; Frequência urinária; Sudorese

0. Ausente :

1. Leve

2. Moderada

3. Grave

4. Incapacitante

## **12. SINTOMAS SOMÁTICOS GASTRINTESTINAIS**

0. Nenhum

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

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

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

0. Nenhum

1. Peso nos membros, nas costas ou na cabeça. Dores nas costas, cefaléia, mialgias.

Perda de energia e cansaço.

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

### **14. SINTOMAS GENITAIS**

Sintomas como: perda da libido, distúrbios menstruais

0. Ausentes

1. Leves

2. Intensos

### **15. HIPOCONDRIA**

0. Ausente

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

2. Preocupação com a saúde

3. Queixas freqüentes, pedidos de ajuda,etc.

4. Idéias delirantes hipocondríacas.

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

A - Quando avaliada pela história clínica

0. Sem perda de peso.
1. Provável perda de peso associada à moléstia atual.
2. Perda de peso definida ( de acordo com o paciente)
3. Não avaliada.

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

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

## **17. CONSCIÊNCIA**

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

## 18. VARIAÇÃO DIURNA

A - Observar se os sintomas são piores pela manhã ou à tarde. Caso NÃO haja variação, marcar "nenhuma".

0. Nenhuma

1. Pior de manhã.

2. Pior à tarde.

B - Quando presente, marcar a gravidade da variação. Marcar "nenhuma" caso NÃO haja variação.

0. Nenhuma.

1. Leve

2. Grave

**NOTA:** Caso haja variação diurna, só a contagem referente à sua gravidade (1 ou 2 pontos no ítem 18B) é que deve ser incluída na contagem final. O ítem 18 A não deve ser computado.

## 19. DESPERSONALIZAÇÃO E PERDA DE NOÇÃO DE REALIDADE

Tais como: sensações de irrealidade, idéias niilistas

0. Ausente

1. Leve.

2. Moderadas..

3. Graves.

4. Incapacitantes.

## **20. SINTOMAS PARANÓIDES**

0. Nenhum.

1. Desconfiança.

2. Idéias de referência.

3. Delírio de referência e perseguição.

## **21. SINTOMAS OBSESSIVOS E COMPULSIVOS**

0. Nenhum.

1. Leves.

2. Graves.

**SOMAR OS PONTOS OBTIDOS EM TODOS OS ÍTENS (EXCETO 18 A)**

**CONTAGEM TOTAL: \_\_\_\_ (0-62)**

## **14. ANEXO 5: APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA**



**HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE**  
**Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação**  
COMISSÃO CIENTÍFICA E COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA EM SAÚDE

**RESOLUÇÃO**

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

**Projeto:** 08-428

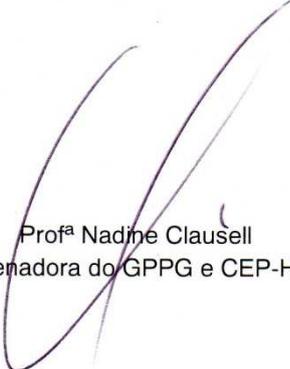
Pesquisador Responsável:
FLAVIO KAPCZINSKI

**Título:** ASSOCIAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS SÉRICOS DE HOMOCISTEÍNA E OS EPISÓDIOS DO TRANSTORNO DE HUMOR BIPOLAR

<b>PROJETO DO ESTUDO NOVA VERSÃO</b>	<b>Data da Versão:</b> 01/08/2009
--------------------------------------	--------------------------------------

Este documento referente ao projeto acima foi Aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos, de acordo com as Diretrizes e Normas Internacionais e Nacionais, especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde.

Porto Alegre, 10 de agosto de 2009.

  
Profª Nadine Clausell  
Coordenadora do GPPG e CEP-HCPA



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

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

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

**Projeto:** 100444

**Versão do Projeto:** 24/09/2010

**Versão do TCLE:** 10/12/2010

**Pesquisadores:**

FÁBRIA CHIARANI

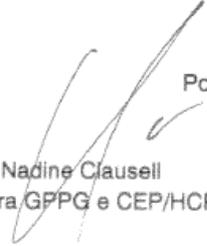
MARCIA KAUER SANT ANNA

**Título:** EXPRESSÃO DE MATRIZ METALOPROTEINASES EM TRANSTORNO DE HUMOR BIPOLAR

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos e metodológicos, bem como o respectivo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, de acordo com as diretrizes e normas nacionais e internacionais de pesquisa clínica, especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde.

- Os membros da Comissão Científica e da Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde não participaram do processo de avaliação dos projetos nos quais constam como pesquisadores.
- Toda e qualquer alteração do projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente ao CEP/HCPA.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao CEP/HCPA.
- Somente poderá ser utilizado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido no qual conste o carimbo de aprovação do HCPA/GPPG.

Porto Alegre, 17 de fevereiro de 2011.

  
Profª Nadine Clausell  
Coordenadora GPPG e CEP/HCPA

## 15. DETALHAMENTO ESTATÍSTICO

Análise de GEE utilizando o modo default do software SPSS v.18.0.0.

Utilizamos matriz de covariância independente com estimação de variâncias robusta.

**Y= variável dependente**

**X1= grupo**

**X2 = covariável**

\* Generalized Estimating Equations.

GENLIN Y BY X1 (ORDER=ASCENDING) WITH X2

/MODEL X1 X2 X1\*X2 INTERCEPT=YES

DISTRIBUTION=# LINK=\*

/CRITERIA SCALE=MLE PCONVERGE=1E-006(ABSOLUTE) SINGULAR=1E-012

ANALYSISTYPE=3(WALD) CILEVEL=95 LIKELIHOOD=FULL

/EMMEANS TABLES=grupo SCALE=ORIGINAL COMPARE=grupo

CONTRAST=PAIRWISE PADJUST=LSD

/REPEATED SUBJECT=ID SORT=YES CORRTYPE=INDEPENDENT

ADJUSTCORR=YES COVB=ROBUST

/MISSING CLASSMISSING=EXCLUDE

/PRINT CPS DESCRIPTIVES MODELINFO FIT SUMMARY SOLUTION.

**#\***

**DISTRIBUTION=GAMMA LINK=LOG**

**DISTRIBUTION= NORMAL LINK=IDENTITY**