

Sofia Alexandra Marques da Silva Amaral Gomes

DOENÇA BIPOLAR: RESPOSTA DAS LCLs EM RESPONDERS E NON-RESPONDERS QUANDO EXPOSTAS AO LÍCIO

Monografia da cadeira de Acompanhamento Farmacêutico do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pela Professora Doutora Maria Dulce Cotrim, da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro de 2013



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, Sofia Alexandra Marques da Silva Amaral Gomes, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2008010832, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Relatório de Monografia, apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade curricular de Acompanhamento Farmacêutico.

Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia desta Monografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 2 de Setembro de 2013

Tutora de Monografia de Acompanhamento Farmacêutico

(Dra. Maria Dulce Cotrim)

A Aluna

(Sofia Alexandra Marques da Silva Amaral Gomes)

“Recomeça...
Se puderes
Sem angústia
E sem pressa.
E os passos que deres,
Nesse caminho duro
Do futuro
Dá-os em liberdade.
Enquanto não alcances
Não descanses.
De nenhum fruto queiras só metade.

E, nunca saciado,
Vai colhendo ilusões sucessivas no pomar.
Sempre a sonhar e vendo
O logro da aventura.
És homem, não te esqueças!
Só é tua a loucura
Onde, com lucidez, te reconheças...”

Miguel Torga

Agradecimentos

Quero agradecer à Professora Doutora Maria Dulce Cotrim, Professora na Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra por ter aceite desde logo orientar-me nesta tese de fim de mestrado. Por toda a ajuda, disponibilidade e força, um muito obrigada.

À Dra. Cynthia Marie-Claire que tão prontamente me recebeu no estágio de investigação na Faculté de Pharmacie - Université Paris Descartes; por todos os ensinamentos, pelo espírito crítico, por toda a ajuda e incentivo que me deu.

Resumo

Este trabalho tem por objectivo dar a conhecer um pouco mais da Doença Bipolar. Esta é uma doença que atravessa as várias camadas da sociedade e que acarreta consequências não só sociais mas também económicas.

Sabendo que os doentes portadores desta desordem psiquiátrica respondem de formas diferentes à medicação e sabendo ainda que pode demorar pelo menos dois anos para se perceber que não há uma resposta farmacológica ideal, é fulcral identificar o mais cedo possível quais os indivíduos que respondem ou não à primeira linha de tratamento farmacológico, o lítio.

Abstract

This work has the purpose to help in acknowledging a little bit more of Bipolar Disorder. This disorder crosses several society layers and brings not only social consequences but also economical ones.

Knowing that the patients who carry Bipolar Disorder have different responses to therapeutics and that it takes at least two years to identify the presence or absence of an “ideal pharmacological outcome”, is mandatory to identify as soon as possible wich patients are *responders* or *non-responders* to the first line of treatment, lithium.

Índice

1. A Doença Bipolar.....	8
2. Tratamento.....	9
2.1. Efeitos Secundários do Tratamento com Lítio.....	10
2.2. Outros Tratamentos.....	11
2.3. Tratamentos Não Farmacológicos.....	12
3. O Gene do BDNF.....	12
4. Mecanismo de Ação do Lítio.....	15
5. Relação entre Doença Bipolar, Alterações do BDNF e Lítio	16
6. Modelo Utilizado.....	16
7. Métodos.....	17
7.1. Isolamento Celular, Cultura e Tratamento Farmacológico.....	17
7.2. Extração de RNA e Transcriptase Reversa para o RT-QPCR.....	18
7.3. PCR Quantitativo em Tempo Real.....	18
7.4. Electroforese.....	19
8. Resultados/ Discussão.....	20
8.1. Validação de pares de primers específicos para os exões do BDNF.....	20
8.2. Efeitos do Lítio nos Exões do BDNF nas LCLs.....	23
Conclusão.....	29
Bibliografia.....	30
Anexos.....	32

I. A Doença Bipolar

A Doença Bipolar (DB) é uma das condições psiquiátricas mais comuns, caracterizando-se por alterações anormais de energia, níveis de atividade e humor. Dado a sua natureza debilitante, ocorrência, e prevalência relativamente alta na população geral (1-2%), a DB representa um problema de saúde pública e um tópico importante na investigação, não apenas devido às elevadas taxas de suicídio que lhe estão associadas mas também devido aos problemas económicos e sociais que dela derivam (Cruceanu et al. 2011). O início da doença tende a ocorrer mais tarde nas mulheres do que nos homens, sendo que os primeiros sintomas costumam aparecer por volta dos 20 anos, mas a idade média de diagnóstico ronda os 25 anos (Arnold 2003). Este distúrbio é também conhecido como doença maníaco-depressiva, está presente (normalmente) durante toda a vida de um indivíduo e é caracterizada por episódios opostos (mania e depressão), mas também por episódios de hipomania e episódios mistos (Tighe et al. 2011) (NIMH, Bipolar Disorder Booklet, 2008).

A mania está associada a um humor irritável, aumento de atividade diária, sentido aumentado de autoestima, raciocínio acelerado, necessidade de dormir diminuída e discurso rápido. Sintomas psicóticos relacionados com alucinações visuais ou auditivas são comuns, especialmente na fase de mania. Por sua vez, os episódios de hipomania são conhecidos por serem versões mais leves dos maníacos, sem os sintomas psicóticos. Durante a fase depressiva, os doentes ficam num estado de tristeza ou apatia, exaustão física, alterações do apetite, dificuldades de concentração e insónias. Sintomas como baixa autoestima ou sentimentos de culpa também são comuns na depressão. Frequentemente surge também a falta de esperança, que muitas vezes leva a pensamentos de suicídio (Tighe et al. 2011) (NIMH, Bipolar Disorder Booklet, 2008). De acordo com o “*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*” (DSM) existem quatro tipos de DB:

- 1. Doença Bipolar I:** episódios maníacos ou mistos que duram pelo menos sete dias, ou sintomas maníacos de tal forma severos que o indivíduo necessita hospitalização imediata. Normalmente estão presentes episódios depressivos que duram pelo menos duas semanas.
- 2. Doença Bipolar II:** padrão alternado de episódios depressivos com episódios hipomaníacos, mas sem episódios maníacos ou mistos.
- 3. Doença Bipolar sem tipo especificado:** diagnosticado quando um indivíduo tem sintomas da doença mas que não se encaixam completamente nos critérios de diagnóstico para DB I ou DBII.

4. Ciclotimia: é uma forma suave de DB. Doentes apresentam sintomas que não se encaixam nos critérios de diagnóstico para nenhum outro tipo de DB

Existem ainda os chamados ciclos rápidos (afectam mais as mulheres que os homens) que acontecem quando um individuo tem quatro ou mais episódios de depressão major, mania, hipomania ou sintomas mistos num espaço de um ano; alguns indivíduos podem experimentar mais que um episódio por semana ou até mesmo um por dia. Estes ciclos rápidos parecem ser mais comuns em casos severos de DB e em indivíduos cujo o seu primeiro episódio foi numa idade precoce (NIMH, Bipolar Disorder Booklet, 2008) (Muller-Oerlinghausen et al. 2002).

2. Tratamento

DB tem tendência a piorar se não for tratada, daí ser fundamental chegar rapidamente, não apenas a um diagnóstico correto mas também a uma terapia adaptada a cada situação.

O Lítio (sal metálico) tem sido o tratamento de escolha para a DB desde há muitos anos. Foi utilizado pela primeira vez em 1840 para o tratamento de cálculos renais e gota, mas só no final do século XIX é que foram reconhecidos os efeitos terapêuticos do lítio para a DB, tendo a sua utilização sido impulsionada por Cade J. em 1949 (Cade 1949). Mogens foi responsável pelos primeiros testes clínicos em doentes com DB durante a década de 50 e 60 (Baastrup and Schou 1967) (Schou 1967) observando que o lítio funcionava particularmente bem, devido à sua eficiência tanto como agente profilático bem como agente terapêutico em crises agudas; além do mais, tem sido utilizado desde então para manter estabilizados doentes com depressão major (Cruceanu et al. 2009).

Clinicamente, o lítio pode ser utilizado em conjunto com outros estabilizadores do humor, antidepressivos e antipsicóticos de forma a facilitar, aumentar ou prolongar a resposta ao tratamento e a ausência de sintomas. Ainda que os efeitos estabilizadores do lítio estejam associados com um determinado numero de ações, os mecanismos bioquímicos envolvidos ainda estão por definir (Chiu and Chuang 2011).

Como outras perturbações psiquiátricas, a DB é altamente heterogénea em termos de sintomatologia e eficácia no tratamento. Vários são os factores que contribuem para o aparecimento desta patologia e podem ser, quer de origem ambiental, quer de origem

genética. A resposta ao tratamento pode ser prevista com base no aparecimento inicial dos sintomas, tais como ausência de sintomas residuais e a polaridade dos primeiros episódios, bem como na ausência de comorbilidades psiquiátricas.

A maioria dos estudos em famílias, investigando se existe ou não uma relação entre a resposta ao lítio e o histórico familiar de DB, confirmaram que é possível estabelecer uma associação entre um aumento da prevalência de DB entre familiares e uma resposta positiva ao tratamento com lítio (Cruceanu et al. 2009). Durante os últimos anos tem sido dada atenção aos efeitos neurotróficos e neuroprotectores do lítio, por isso mesmo não têm sido poupados esforços em estudos clínicos para percebermos se há aplicabilidade desta terapêutica a outros modelos de doença tais como Acidente Vascular Cerebral, Doença de Huntington, Esclerose Lateral Amiotrófica, Traumatismo Craniano, Degeneração Cerebelar, Lesões na coluna vertebral e possivelmente Doença de Alzheimer e Parkinson. O lítio também demonstrou ser capaz de proteger o SNC contra agressões neuronais (Chiu and Chuang 2011) (Machado-Vieira et al. 2009) (Chiu and Chuang 2010). Para além dos efeitos neurotróficos e neuroprotectores, estimula a neurogénese (células progenitoras que proliferam e se diferenciam em novos neurónios funcionais, permitindo assim a substituição de outros neurónios em determinadas regiões do cérebro). Este processo é evidente não só durante o desenvolvimento mas também durante a fase adulta, ocorrendo em especial no giro dentado do hipocampo e no bulbo olfactivo. Uma das possibilidades relacionadas com a neurogénese é o efeito positivo que o lítio tem na regulação do factor neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), peptídeo necessário para a neurogénese no hipocampo. Todas estas características do lítio - como a promoção da neurogénese e redução de défices que possam ser provocados por variadas agressões - sugerem que este fármaco apresenta elevada significância para o tratamento de condições neurodegenerativas e neuropatológicas (Chiu and Chuang 2010).

2.1. Efeitos Secundários do Tratamento com Lítio

Uma vez que a DB acarreta consigo bastante heterogeneidade, nem todos os doentes respondem de forma adequada ao tratamento com lítio, e até mesmo os que respondem de forma positiva acabam por desenvolver alguns efeitos secundários. Efeitos tóxicos renais tais como diabetes insipidus que parece ser causada através da inibição do GSK3 β , que é um dos alvos do lítio mais bem caracterizados. Alguns relatórios de mulheres grávidas em início de

tempo, sugeriram fortes efeitos teratogénicos; contudo, reavaliações mais recentes mostram que os efeitos são dependentes da dose e podem ser diminuídos controlando a ingestão de lítio não só durante a gravidez mas durante um período pós-parto. Outro efeito secundário muito demarcado é o aumento de peso que acarreta consigo uma série de implicações a longo prazo para o bem estar físico e psicológico do doente.

Assim sendo, é importante que se faça a monitorização destes doentes para garantir que a dose é a correta, mas também para prevenir problemas renais ou outros problemas que possam surgir a longo prazo (Cruceanu et al. 2009) (Oliveira et al. 2010).

Os níveis de hormonas da tiroide (Tiroxina (T4) e Triiodotironina (T3)) desempenham um papel crucial nesta desordem, já que podem influenciar o humor e os níveis de energia, daí que também seja importante avaliar os níveis destas hormonas. O hipotireoidismo tem estado associado com ciclos rápidos em algumas pessoas com DB, especialmente em mulheres (NIMH, Bipolar Disorder Booklet, 2008).

Sem duvida que os benefícios estabilizadores do lítio para os doentes ultrapassam os malefícios. Contudo, em alguns casos, a inconveniência dos efeitos secundários levam a uma não adesão à terapêutica, o que por sua vez leva ao aparecimento dos sintomas e a comportamentos suicidas (Cruceanu et al. 2009) (Oliveira et al. 2010).

2.2. Outros Tratamentos

A monoterapia é algo bastante difícil de conseguir. Os tratamentos farmacológicos de primeira linha incluem lítio, valproato (antiepiléptico) e antipsicóticos atípicos como risperidona, olanzapina e quetiapina - não induzem depressão - quer sozinhos quer em combinação. Tratamentos adicionais como carbamazepina, oxcarbazepina, clozapina (antiepilépticos) podem ser utilizados em monoterapia ou em combinação com um fármaco da primeira linha farmacológica, quando esses por si só são insuficientes (Alda et al. 2009) (Fountoulakis et al. 2007).

Atualmente a depressão ainda se mantêm como o sintoma mais notório da DB (Judd et al. 2002). Ainda que estes doentes passem mais tempo num estado depressivo que num estado maníaco, e mesmo com as várias opções de tratamento disponíveis, a sua eficácia é baixa. Mesmo que os antidepressivos apresentem alguma eficácia para a depressão na DB, é necessário que sejam utilizados com precaução, uma vez que podem levar a uma mudança

para mania, induzir ciclos rápidos ou mesmo piorar a depressão. Os riscos apresentados por esta categoria de fármacos estão reconhecidos nas *guidelines* terapêuticas, que normalmente recomendam o uso de estabilizadores de humor em regime de monoterapia, ou uso consciencioso de antidepressores associados a estabilizadores de humor (Young et al. 2000). Até agora, a FDA aprovou apenas dois tratamentos para a doença bipolar, olanzapina em combinação com fluoxetina e a quetiapina. Inibidores da recaptação da serotonina, como a venlafaxina e bupropiona estão indicados quando os estabilizadores do humor falham. Os antidepressivos tricíclicos estão a ser evitados neste momento, pois são considerados como sendo possíveis causadores de ciclos rápidos e da indução de estados de mania. Entre os antidepressivos mais antigos, os inibidores da monoamina oxidase (IMAO) apresentam eficácia para o tratamento da doença bipolar (Thase 2006) (Alda et al. 2009) (Fountoulakis et al. 2007).

2.3. Tratamentos não-farmacológicos

Por vezes, tratamentos não-farmacológicos são considerados como importantes aditivos para intervenções farmacológicas realizadas desde o início em populações de alto risco, previamente identificadas. A terapia comportamental cognitiva, psicoterapia e a terapia interpessoal podem ser úteis na redução da probabilidade de desenvolver DB em sujeitos com uma elevada carga genética. A terapêutica electroconvulsante é uma alternativa nos casos em que a medicação e/ou a psicoterapia não funcionam. Este tipo de terapia ajuda em casos em que os doentes apresentam uma forma severa de DB e que não conseguem uma melhoria significativa recorrendo à terapêutica ou em casos de gravidez (Salvadore et al. 2008) (NIMH, Bipolar Disorder Booklet, 2008).

3. O Gene do BDNF

O factor neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) faz parte dos factores de crescimento nervoso, que por sua vez pertencem às neurotrofinas. É considerado como a principal neurotrofina do cérebro, sendo produzido principalmente pela glia e pelos núcleos neuronais.

Durante o desenvolvimento dos seres humanos, o BDNF é responsável pela sobrevivência e

diferenciação de determinadas populações neuronais dos sistemas nervoso central e periférico, participa no crescimento axonal, modula o crescimento dendrítico e a morfologia. O BDNF também tem um papel proeminente nos estágios mais tardios do desenvolvimento do sistema nervoso, e no adulto, está demonstrado que é capaz de regular transmissões sinápticas, a plasticidade e atuar como um modulador central da dor. O BDNF foi demonstrado como sendo um modulador da sinapsogénese *in vivo*. Informações acumuladas ao longo dos últimos anos, sugerem que a atividade neuronal regula a transcrição do BDNF, o transporte do mRNA (BDNF) e a secreção de peptídeo (BDNF), que são aspectos importantes para a formação de conexões sinápticas apropriadas e contribuem assim para a aprendizagem e memória durante o desenvolvimento e fase adulta (Pruunsild et al. 2007). Estudos anteriores sugerem que alterações no gene do BDNF aumentam o risco de desenvolver esquizofrenia e doença bipolar (Lohoff et al. 2005) (Chen et al. 2006) (Cunha et al. 2006). Um polimorfismo de um só nucleotídeo no gene do BDNF humano, a substituição da valina por metionina (Val66Met), leva à redução de secreção do BDNF, o que acaba por trazer impactos a nível de memória (Gama et al. 2007). A sinalização do BDNF tem-se mostrado crítica em diversas patologias neuropsiquiátricas e neurodegenerativas, como por exemplo, doença de Huntington. Quando avaliados em conjunto, estes resultados mostram que o BDNF desempenha vários papéis importantes no desenvolvimento cerebral, na fisiologia e na patologia.

Durante o desenvolvimento, a expressão proteica do BDNF é mais abundante no sistema nervoso do que noutros tecidos e os seus níveis encontram-se muito aumentados no cérebro durante o desenvolvimento pós-natal. No sistema nervoso dos adultos, o BDNF apresenta um padrão de distribuição muito disperso, com os níveis mais altos de mRNA e de proteína no hipocampo, amígdala, córtex cerebral e hipotálamo. A expressão de mRNA está na sua maioria confinada aos neurónios e há apenas algumas áreas no cérebro onde esta expressão não é detectada. Existem outros tecidos - fora do sistema nervoso central - nos quais é possível detectar a expressão de BDNF, nomeadamente timo, fígado, baço, coração e pulmão.

O BDNF humano parece ser constituído por múltiplos 5' exões não codificantes e um exão codificante (IX), que dão origem a transcritos obtidos através de splicing alternativo (figura I). De acordo com a mais recente descrição e organização do gene BDNF humano e transcritos resultantes de splicing alternativo, o BDNF humano tem 7 exões não codificantes e um exão codificante.

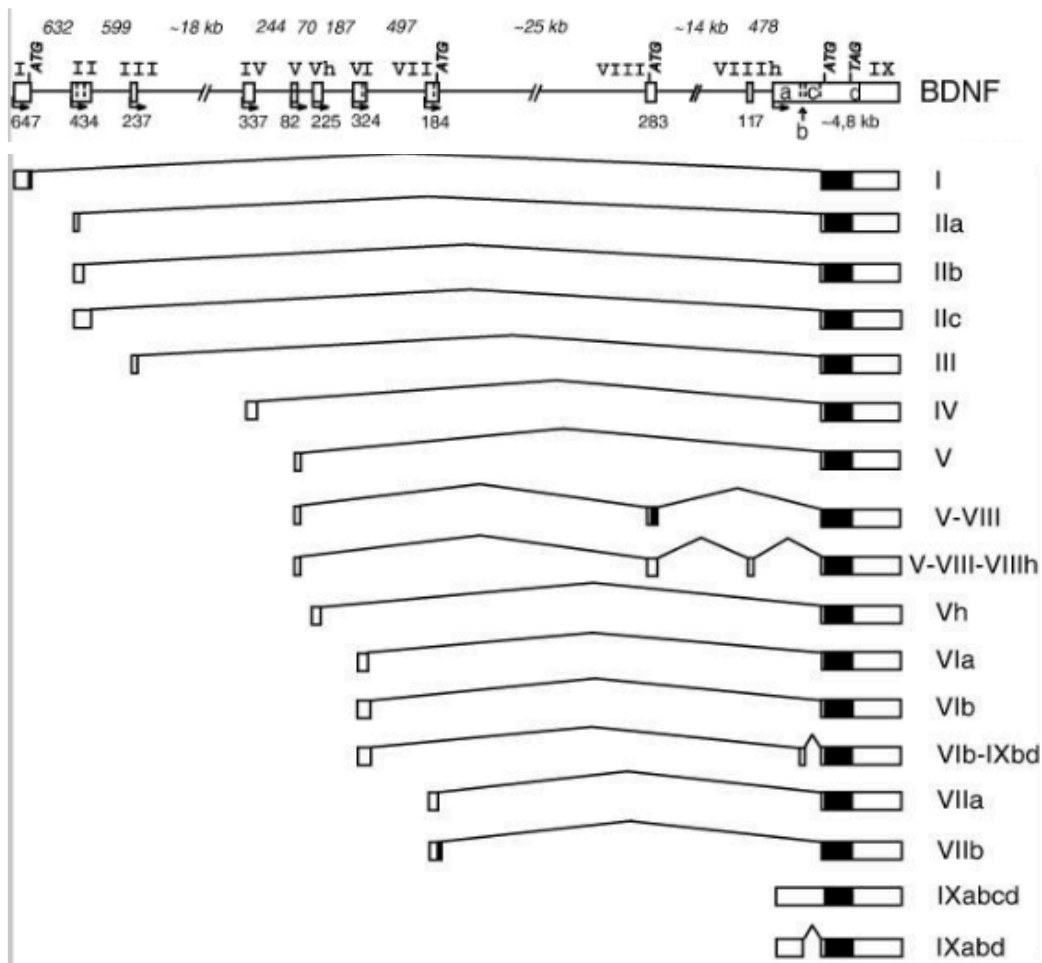


Fig.1: Estrutura e transcritos alternativos do gene do BDNF humano

Todos os transcritos são expressos em níveis elevados no cérebro. No entanto, outros transcritos foram encontrados em elevadas concentrações em diferentes tecidos periféricos, como por exemplo, transcritos contendo os exões VI e IXabcd no coração, placenta e próstata; transcritos contendo os exões I, Vh, VI e IXabcd estão altamente expressos nos testículos; transcritos contendo exão VI estão expressos nos pulmões. Níveis moderados ou baixos de transcritos também foram encontrados nas glândulas adrenais, medula óssea, rim, músculo, espinal medula, fígado, intestino delgado e estômago (Pruunsild et al. 2007).

4. Mecanismo de Ação do Lítio

O lítio atua diretamente por inibição da enzima inositol monofosfato fosfatase (IMPase). Ao haver acoplamento de um ligando aos receptores da proteína G há ativação do PLC (fosfolipase c) o que provoca a hidrólise do PIP₂ (fosfatidilinositol-4,5 difosfato) em inositol-1,4,5 trifosfato (IP₃) e DAG (diacilglicerol). O IP₃ estimula a liberação de Ca²⁺ das reservas celulares e o DAG ativa a proteína cinase C (PKC).

Quando os receptores estão ocupados ocorre uma inibição a longo termo da IMPase o que provoca uma depleção dos níveis de mioinositol e uma acumulação da DAG seguida de uma downregulation do PKC.

Por outro lado o lítio inibe a glicogénio sintase cinase-3 (GSK-3) o que ajuda a estabilizar a β -catenina; esta entra no núcleo e ativa os genes dependentes do LEF/TCF. De uma forma hipotética, julga-se que os genes ativados pelo LEF e TCF, são ativados graças às vias de sinalização celular do PKC e do GSK -3. (Lenox and Wang 2003)

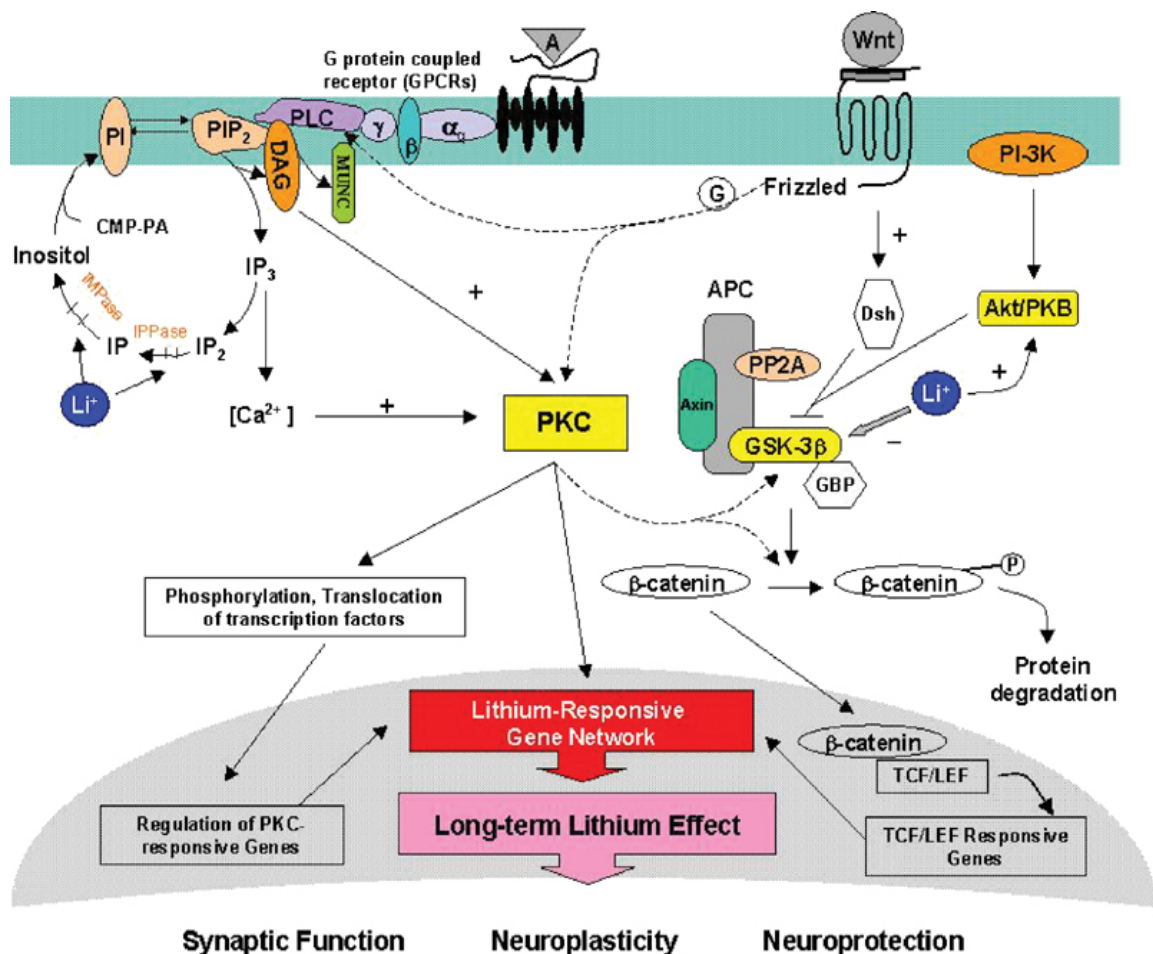


Fig. 2: Vias de sinalização do lítio tendo em conta o PI/PKC e GSK-3

5. Relação entre Doença Bipolar, Alterações do BDNF e Lítio

Alterações neurodegenerativas significativas são características da DB e podem ser mais acentuadas nas fases iniciais da doença (primeiros 5 a 10 anos) levando a uma diminuição dos níveis de BDNF – menos neurogénese e menos efeitos neurotróficos e neuroprotectores. Há relatos de níveis plasmáticos baixos de BDNF não só aquando do primeiro episódio da DB, mas também durante episódios maníacos e depressivos. Estabeleceu-se então, uma relação inversa entre os níveis de BDNF e os valores em escalas psicopatológicas em doentes que foram identificados com esta condição. Além disso, estudos farmacológicos (Fukumoto et al. 2001) (Chuang et al. 2002) têm demonstrado que uma administração crónica de lítio, valproato e fármacos antipsicóticos como clozapina, aumenta a expressão de BDNF em cérebros de ratos (Gama et al. 2007) (de Sousa et al. 2011). Evidências da literatura permitem estabelecer uma relação entre a resposta ao tratamento com lítio e o aumento dos níveis plasmáticos de BDNF (Gama et al. 2007) (Wolkowitz et al. 2011).

O objetivo deste estudo é conseguir identificar respostas moleculares (tais como aumento/diminuição de expressão de exões, expressão de BDNF) em *responders* e *non responders* de forma a que no futuro tais estudos se possam aplicar à prática clínica do dia a dia e assim, melhorar a qualidade de vida dos doentes bipolares, uma vez que podem ser direcionados muito mais cedo para a terapêutica mais correta para o seu caso.

6. Modelo Utilizado

Os ensaios realizados foram feitos em modelos de LCLs (linhas celulares linfoblastóides) que não são mais do que linfócitos imortalizados com vírus Epstein-Barr (o que aumenta a atividade das telomerasas). Neste caso, uma vez que estamos a estudar a DB (doença neurológica), o acesso ao cérebro de doentes é virtualmente impossível. Desta forma as LCLs representam não só fontes ilimitadas de DNA mas também de outras biomoléculas, eliminando a necessidade de recolher várias vezes amostras dos doentes, o que se traduz num menor desconforto para os mesmos. O objectivo dos ensaios realizados é perceber de que forma é que o lítio afecta os níveis de BDNF expressos nas LCLs e quais os promotores que são ativados (na presença de lítio) para os *responders* e *non responders*. Apesar das LCLs imortalizadas pelo EBV não serem células neuronais, estas têm sido utilizadas como modelos

celulares para doenças como a doença de Alzheimer, a doença de Huntington e a doença Bipolar (Iwamoto et al. 2004) (Tseng et al. 2008).

Como referido anteriormente, em muitas doenças neurológicas, o acesso aos tecidos do sistema nervoso central, para diagnóstico ou investigação, na maioria das vezes não está disponível (Sie et al. 2009) (Wheeler and Dolan 2012) assim, como o modelo das LCLs apresenta baixas taxas de mutações somáticas (0.3%) e uma fácil manipulação, para além das outras vantagens referidas anteriormente, fazem com que estas sejam um alvo preferencial no que toca a recolher e armazenar material genético de doentes.

Nesta fase do projeto estudámos um grupo de 8 doentes com DB I, 4 deles respondem à terapêutica com lítio (*responders*), enquanto que os outros 4 não respondem à terapêutica com lítio (*non responders*). Todos os doentes foram diagnosticados com DB I sem outras comorbilidades. Os *responders* foram mantidos em monoterapia com lítio durante pelo menos 3 anos e sem presença de episódios durante esse período. Os *non responders* foram tratados com lítio durante pelo menos 2 anos sem modificação da frequência de crises necessitando de um suplemento farmacológico (antidepressivo, antiepilético...).

7. Métodos

7.1. Isolamento Celular, Cultura e Tratamento Farmacológico

Geraram-se linhas celulares linfoblastóides a partir de amostras de sangue de doentes bipolares de um coorte francês. Os linfócitos B foram transformados com o vírus Epstein-Barr e foram depois colocados em culturas com meio RPMI rico em glutamina (Life Technologies) contendo 10% de soro fetal bovino com 100 unidades/mL de penicilina, 100 unidades/mL estreptomicina, numa incubadora com 5%CO₂/95% ar a 37°C. As células pertencentes aos *responders* e *non-responders* foram tratadas com 1 mM de cloreto de lítio (LiCl) e veículo (H₂O ppi), respectivamente. As células foram colhidas ao fim de 4, 8 e 15 dias.

7.2. Extração de RNA e Transcriptase Reversa para o RT-QPCR

A extração de RNA total foi feita a partir de LCLs (pellets de 5 milhões de células) utilizando o mini kit miRNeasy Qiagen de acordo com o protocolo fornecido pelo produtor (Qiagen). Fez-se uma quantificação do RNA total por espectrofotometria usando o NanoDrop ND-1000 (Nanodrop Technologies Inc. – Anexo: Figura 2). A transcrição reversa do RNA foi feita num volume final de 20µL contendo 4 µL tampão 5X RT (3 mM MgCl₂, 75 mM KCl and 50 mM tris-HCl), 1 µL de cada trifosfato de desoxinucleótido (500 µM), 0,5 µL de RNaseOUT™ que atua como inibidor da ribonuclease (Life Technologies), 2 µL de 1,4-ditiotreitol (DTT) (10 µM), 0,5 µL de transcriptase reversa (Superscript II RNase - Life Technologies), 1,5 µM de hexâmeros aleatórios – sequências aleatórias de 6 pares de bases que permitem que todo o RNA extraído sirva de base para a síntese da primeira cadeia de cDNA (GE Healthcare, Vélizy, França) e 1 µg de RNA total. As amostras foram depois incubadas a 25°C durante 10 minutos, a 42°C durante 30 minutos e a 99°C durante 5 minutos. No final da transcriptase reversa, os cDNAs foram armazenados a -20°C.

7.3. PCR quantitativo em Tempo Real

As sequências nucleótídicas dos *primers* foram escolhidas com a ajuda do software Oligo 7 (MedProbe). Os *primers* foram desenhados em exões separados de forma a garantir apenas a polimerização de mRNAs maduros. A expressão genética foi avaliada através de RT-QPCR. As amplificações foram detectadas por fluorescência causada por Sybr Green num sistema de detecção 7900HT (Applied Biosystems – Anexo: Figura 3). A reação em cadeia da polimerase foi feita num volume final de 20 µL contendo 1 µL de cada *primer* e 10 µL de Power Sybr Green PCR Master Mix 2X (Applied Biosystems). De seguida adicionaram-se 8 µL de cDNA previamente diluído numa concentração final de 250ng/µL. As condições do termociclagem foram 2 minutos a 50°C, seguindo-se 10 minutos a 95°C seguidos de 40 ciclos de amplificações a 95°C durante 15 segundos e depois a 60 ou 65°C (dependendo do par de *primers* em causa) durante 45 segundos e, por fim, mais 15 segundos a 95°C. A quantificação foi feita com base numa curva de calibração utilizando cDNA de cérebro humano (Belkai, Scherrmann et al. 2009).

Produto de PCR	Sequência de Primers	Condições	Tamanho do Amplicão
BDNF I	583U23 63527L23 GCATCTGTTGGGGAGACGAGATT/ GCAGCCTTCATGCAACAAAAGTA	95°C (15seg) + 65°C (45seg)	117 PB
BDNF III	2523U19 63527L23 GGGCCGGATGCCTCACTGA/ GCAGCCTTCATGCAACAAAAGTA	95°C (15seg) + 65°C (45seg)	78 PB
BDNF IV	20697U18 63527L23 TGGGGCCGAAGTCTTTCC/ GCAGCCTTCATGCAACAAAAGTA	95°C (15seg) + 60°C (45seg)	118 PB
BDNF V	21051U20 63527L23 CGTTCGCAAGCTCCGTAGTG/ GCAGCCTTCATGCAACAAAAGTA	95°C (15seg) + 65°C (45seg)	90 PB
BDNF VI	21866U22 63527L23 GGACCCGTGAGGTTTGTGTGGA/ GCAGCCTTCATGCAACAAAAGTA	95°C (15seg) + 65°C (45seg)	64 PB
BDNF VII2	22617U21 63527L23 ACGTGGGGGATTCTTGACTCG/ GCAGCCTTCATGCAACAAAAGTA	95°C (15seg) + 65°C (45seg)	113 PB
BDNF IX	63429U23 63557L23 AGCCCTAACCAGTTTTCTGTCTT/ TGCCTCGGATGTTTGCTTCTT	95°C (15seg) + 65°C (1min)	128 PB
BDNF ALL	63619U20 6708L21 TCTGGAGAGCGTGAATGGGC/ GCCGAACCTTCTGGTCCTCAT	95°C (15seg) + 65°C (45seg)	110 PB
HPRT I	33374U22 38255L21 ACACTGGCAAACAATGCAGAC/ ACACTTCGTGGGGTCCTTTTC	95°C (15seg) + 65°C (45seg)	102 PB

Tabela I: Sequências dos pares de primers, condições de PCR e tamanho dos amplicões

7.4. Electroforese

De forma a avaliar a pureza dos produtos finais obtidos por PCR fez-se uma electroforese em gel de agarose. Este gel foi preparado a uma concentração de 2% com 2 g de agarose para 100 mL de Tampão Tris Borato EDTA (TBE) IX. A mistura foi depois aquecida no

microondas durante 2/3 minutos. Quando se obteve uma solução límpida, adicionou-se um magnete e colocou-se o erlenmeyer no agitador magnético até a solução atingir os 50/60 °C; adicionou-se brometo de etídio (8 µL de brometo de etídio/ 20 mL gel). A mistura foi depois colocada num recipiente apropriado durante 15 a 20 minutos de forma a permitir a sua polimerização. Enquanto se esperava que a polimerização ocorresse, foram adicionados 2 µL de *DNA Blue* em cada poço da placa de PCR. Adicionaram-se 5 µL de amostra em cada poço do gel e deixou-se o gel a correr durante 20 a 25 minutos a 100 Volts. Foram obtidas imagens referentes aos resultados recorrendo ao Chemidoc XRS (BioRad – Anexo: Figura 4)

8. Resultados/ Discussão

8.1. Validação de pares de primers específicos para os exões do BDNF

Os pares de primers desenhados, foram utilizados em PCRs quantitativos em tempo real, sendo que depois, foram analisadas as Cts, as curvas de dissociação e as curvas de calibração. Para validar um par de primers, a curva de dissociação só pode apresentar um pico, que representa a amplificação da sequência que pretendia amplificar; quanto à curva de calibração, esta deve ter um declive próximo de -3,33 o que significa que a eficiência do PCR foi de 100%; uma boa reação tem uma eficiência entre 90% a 110%, o que corresponde a um declive entre -3,58 e -3,10. O R^2 deve apresentar valores ≥ 0.98 . O último passo consiste na realização de uma electroforese para verificar se cada par de primers amplifica (verdadeiramente) apenas uma única sequência de DNA.

Para validar os 8 pares de primers, foram testados 18 pares, dos quais, alguns não amplificavam sequência alguma de DNA enquanto outros não eram suficientemente específicos (dimerizações dos primers ou amplificações não específicas). Dos pares de primers testados inicialmente, 9 foram validados – BDNF exão I, III, IV, V, VI, VII2, IX, ALL e um gene de referência – este deve ser expresso em todas as células e os seus níveis de expressão não devem sofrer alterações significativas quando expostos a variáveis experimentais (HPRT I). Depois de se ter tentado amplificar o exão II – sem sucesso – tomou-se a decisão de não redesenhar novos primers para este exão uma vez que o exão II é específico apenas para o cerebelo e o cDNA utilizado para a validação era de cérebro. A mesma decisão foi tomada para o exão Vh, uma vez que, após se terem desenhado 5 pares

de primers diferentes não se conseguiu que nenhum deles fosse específico o suficiente para amplificar apenas uma sequência específica (fluorescência não específica).

Os primers foram primeiramente testados em RNA proveniente de cérebro humano, uma vez que a maioria dos transcritos do BDNF são expressos neste tecido. Os exões I, III, IV, V, VI, VII2, IX e ALL foram detectados no RNA de cérebro humano, contudo, nas LCLs não foi possível detectar os exões III, V e VII2 o que é indicativo de que nestas linhas celulares, os promotores em causa não foram ativados.

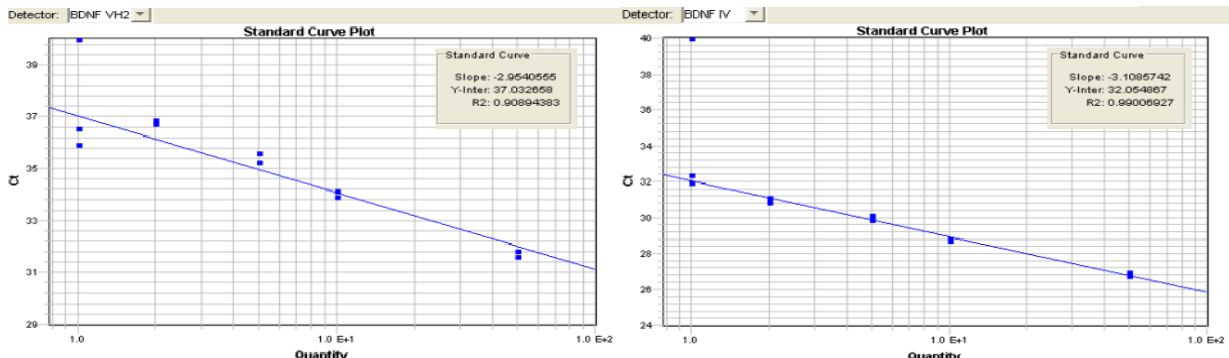


Fig. 3: Curvas de Calibração para o BDNF Vh2 e IV, respectivamente

Na Fig. 3, estão representados dois exemplos de curvas de calibração (BDNF Vh2 e IV). O R^2 é bastante importante para avaliar a qualidade da curva de calibração. O R^2 da primeira curva é de 0,908 enquanto que o R^2 da segunda é de 0,99, o que leva à conclusão de que a primeira curva não tem bons duplicados enquanto que a segunda tem; assim sendo, a curva de calibração do BDNF IV é mais exata.

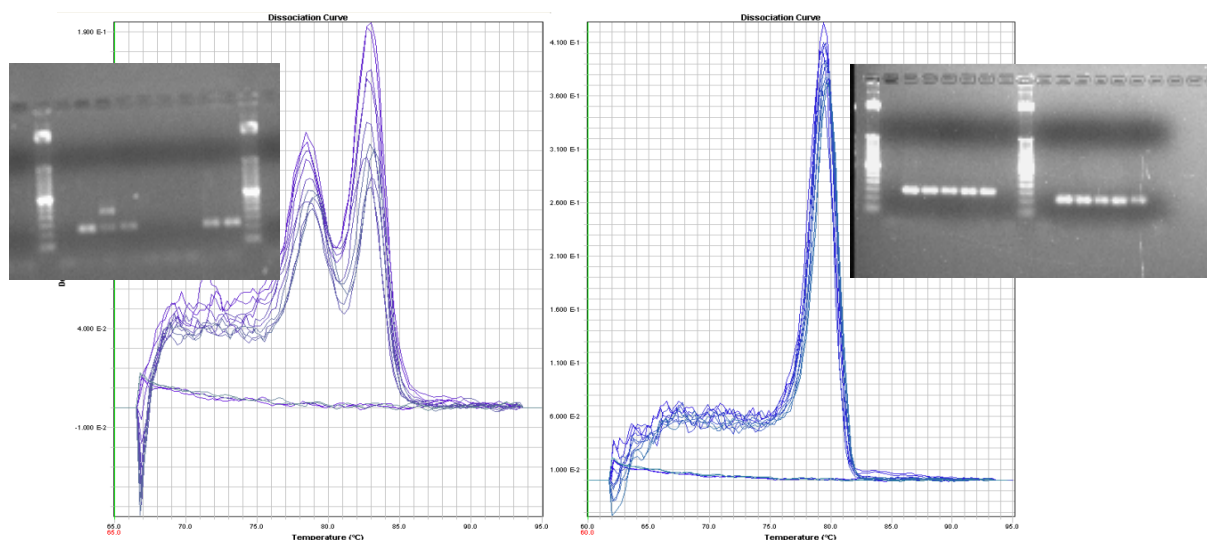


Fig. 4: Curvas de dissociação e gel de electroforese para BDNF Vh2 e IV

A Fig. 4 mostra dois exemplos de curvas de dissociação (BDNF Vh2 e IV). Como se pode ver na primeira curva, existem dois picos que representam duas temperaturas de melting (Tm) diferentes - a Tm corresponde à temperatura para a qual 50% do dsDNA se encontra hibridada - isto indica que para além do produto de PCR que se pretendia amplificar foi também amplificado um segundo dsDNA não específico.

Para a segunda curva de dissociação, existe apenas um pico (uma única Tm) o que significa que este par de primers é específico o suficiente para amplificar apenas a sequência pretendida.

A curva de dissociação e a electroforese são muito úteis para saber se existe algum tipo de contaminação, o que se traduz mais tarde, na presença de mais que uma banda no gel de agarose. Como se pode ver na Fig. 4, foram detectadas duas bandas para o BDNF Vh2. Esta falta de especificidade dos primers, explica o porquê de não ter sido possível validar os primers para o exão Vh2.

Detector	Task	Ct	Ct Median	Quantity	Detector	Task	Ct	Ct Median	Quantity
BDNF Vh2	NTC	Undetermined	0		BDNF IV	NTC	Undetermined	0	
BDNF Vh2	NTC	Undetermined	0		BDNF IV	NTC	Undetermined	0	
BDNF Vh2	Standard	31.823256	5E1		BDNF IV	Standard	26.735249	5E1	
BDNF Vh2	Standard	31.841562	5E1		BDNF IV	Standard	26.946722	5E1	
BDNF Vh2	Standard	33.920925	10		BDNF IV	Standard	28.83066	10	
BDNF Vh2	Standard	34.141857	10		BDNF IV	Standard	28.744251	10	
BDNF Vh2	Standard	35.616726	5		BDNF IV	Standard	30.129608	5	
BDNF Vh2	Standard	35.259827	5		BDNF IV	Standard	29.885954	5	
BDNF Vh2	Standard	36.71613	2		BDNF IV	Standard	30.846746	2	
BDNF Vh2	Standard	36.876087	2		BDNF IV	Standard	31.099987	2	
BDNF Vh2	Standard	35.933216	1		BDNF IV	Standard	31.955143	1	
BDNF Vh2	Standard	36.54307	1		BDNF IV	Standard	32.376923	1	
BDNF Vh2	Standard	Undetermined	1		BDNF IV	Standard	Undetermined	1	
BDNF Vh2	Unknown	Undetermined	0		BDNF IV	Unknown	Undetermined	0	

Fig. 5: Cts do BDNF Vh2 e IV

Num PCR quantitativo estabelece-se um valor de fluorescência abaixo do qual existe apenas fluorescência não específica que vai aumentando à medida que o PCR avança, o momento no qual a fluorescência detectada cruza o valor estabelecido é conhecido como Ct.

Olhando para a tabela das Cts do BDNF Vh2, a primeira Ct é de ≈ 31.823 e a última Ct é de ≈ 36.543 , enquanto que para o BDNF IV a primeira Ct é de ≈ 26.735 e a última é de ≈ 32.376 . Comparando as Cts de ambos os exões é possível perceber que a sequência alvo que se pretendia amplificar é mais abundante no caso do BDNF IV já que o produto de PCR é

detetado mais cedo. Assim sendo, estes dados mostram que a expressão do BDNF Vh2 é mais baixa do que a do IV.

Usualmente amostras que apresentem Cts superiores a 38 são indicativas de quantidades mínimas de ácido nucleico, o que pode ser representativo de uma baixa expressão ou de uma contaminação. Como tal, neste estudo, amostras com Cts > 38 não foram tidas em conta.

8.2. Efeitos do Lítio nos Exões do BDNF nas LCLs

Uma vez que o principal órgão afectado nas doenças mentais é o cérebro, isto traduz-se num acesso muito limitado em doentes vivos, torna-se então crucial encontrar biomarcadores periféricos que permitam não só um diagnóstico diferencial, mas também que ajudem a prever a resposta à terapêutica (D'Addario, Dell'Osso et al. 2012). Neste contexto, as LCLs podem ser um importante modelo in vitro.

Normalmente, na prática clínica, de forma a analisar os níveis de BDNF em doentes bipolares o peptídeo é doseado no plasma. Neste caso, a cinética com lítio foi feita em LCLs de *responders* e *non responders* que foram recolhidas quando os doentes estavam estabilizados em termos de humor e após isso, as LCLs foram infectadas com EBV.

Todos os valores para os níveis de expressão do BDNF ao dia 4, dia 8 e dia 15 foram normalizados com os valores pertencentes aos *non responders* Li, assim esse grupo assume o valor de 1. OS gráficos representam as quantidades expressas de BDNF/HPRT (gene de referência) em cada dia – do dia 4 ao dia 15. Cada valor representado no gráfico representa a média \pm desvio padrão.

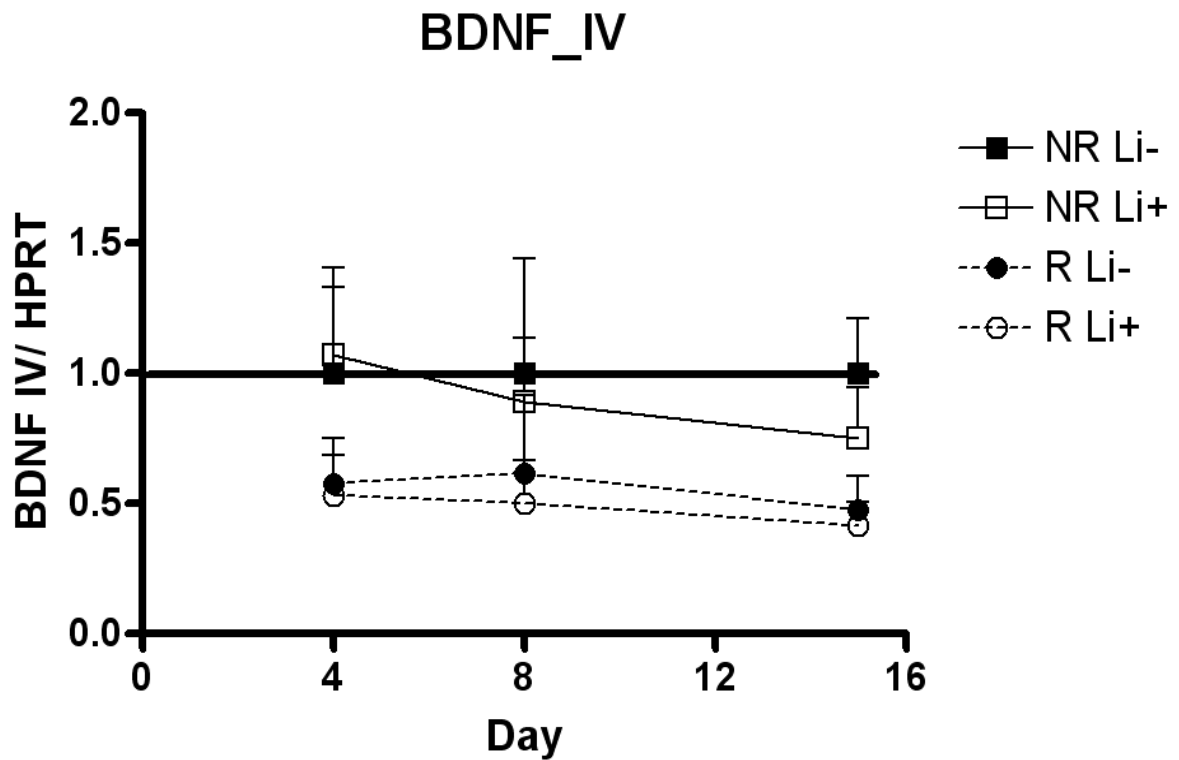


Fig. 6: Níveis de expressão do BDNF IV/HPRT no dia 4, 8 e 15

A Fig. 6 representa toda a cinética para o BDNF exão IV. Os *non responders* expressam mais BDNF IV do que os *responders* (quase duas vezes mais). Dentro do grupo dos *non responders*, é possível ver que a presença do lítio parece causar uma tendência para diminuir a expressão do BDNF durante toda a cinética. Para os *responders*, as LCLs expostas ao lítio apresentam níveis ligeiramente mais baixos do que as não expostas. Contudo, é importante ter em conta que estes valores não têm significância estatística, por isso apenas se podem retirar conclusões preliminares.

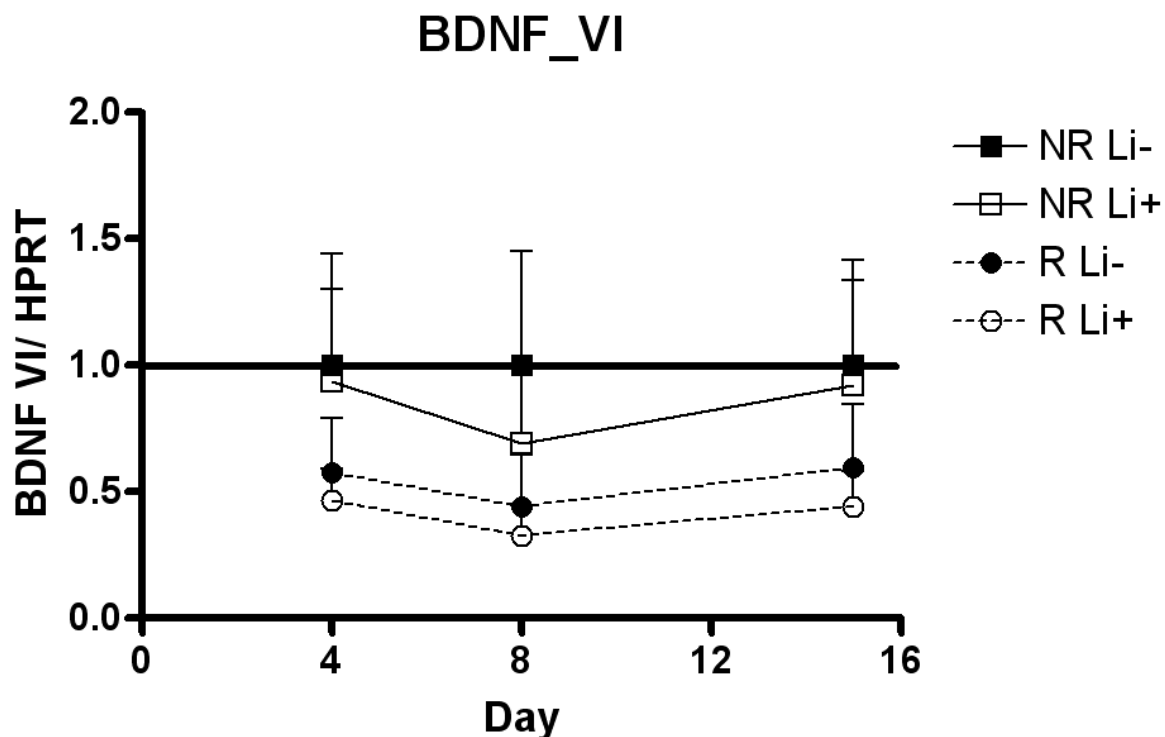


Fig. 7: Níveis de expressão do BDNF VI/HPRT no dia 4, 8 e 15

A Fig. 7 representa a cinética para os níveis de expressão do BDNF VI (dia 4, dia 8 e dia 15). Neste caso, também os *non responders* expressam níveis de BDNF mais altos, quando comparados aos *responders*. A presença do lítio parece afectar a expressão em ambos os grupos (*non responders* e *responders* expressam menos quando expostos ao lítio). Do dia 4 ao dia 8 é visível que há uma diminuição dos níveis de BDNF para os *non responders* e *responders*, mas do dia 8 ao dia 15 há um aumento nos níveis (atingindo-se quase os mesmos valores que ao dia 4).

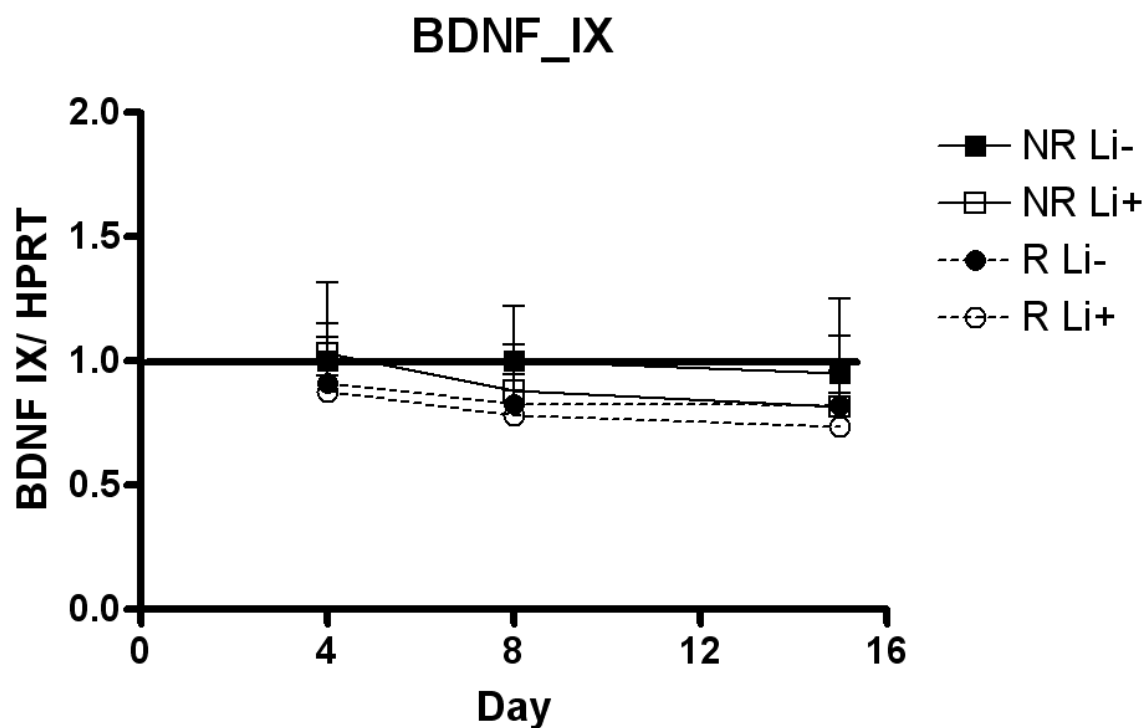


Fig. 8: Níveis de expressão do BDNF IX/HPRT no dia 4, 8 e 15

A Fig. 8 mostra a cinética para a expressão dos níveis de BDNF IX (dia 4, dia 8 e dia 15). Também aqui é possível ver que os *non responders* expressam mais BDNF IX quando comparados aos *responders*, contudo, a diferença nos níveis de expressão não é tão acentuada como para o BDNF IV e VI. Também neste caso, é possível ver uma ligeira tendência para os *non responders* e *responders*, quando expostos ao lítio, expressarem níveis mais baixos de BDNF IX.

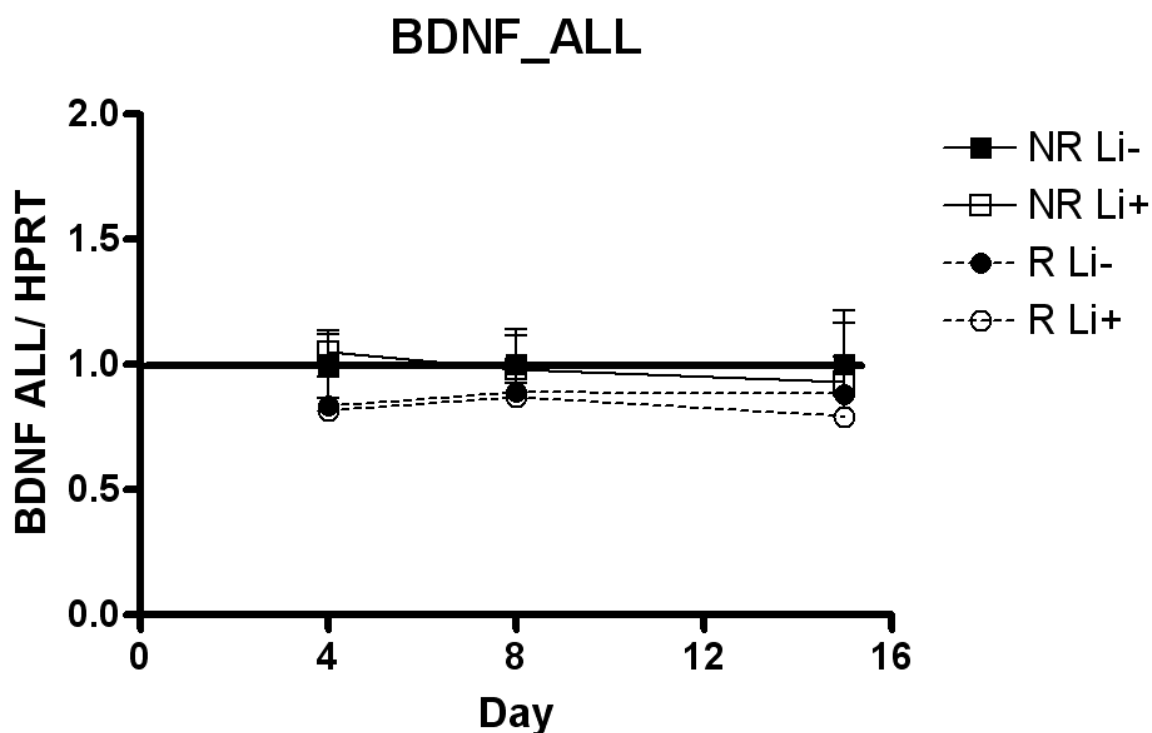


Fig. 9: Níveis de expressão do BDNF ALL/HPRT no dia 4, 8 e 15

A Fig. 9 representa o BDNF ALL, este é nada mais do que a soma de todos os transcritos dentro do gene do BDNF. No BDNF ALL há uma ligeira tendência para os *non responders* expressarem mais do que os *responders*. No grupo dos *non responders*, à medida que o tempo vai passando, há tendência para uma diminuição nos níveis de expressão; para os *responders*, acontece o oposto, há um ligeiro aumento de expressão.

O problema neste caso, é que todos os exões expressam maiores níveis de BDNF para os *non responders* do que para os *responders*, e se o BDNF ALL representa a soma de todos os transcritos, e os níveis de expressão para o BDNF ALL são quase os mesmos para os *non responders* e *responders*, deveria haver pelo menos um exão que deveria expressar um nível mais alto para os *responders*, de forma a compensar.

É importante manter em mente que estes resultados são baseados em 8 amostras de *non responders* (tratadas com e sem lítio) e 8 amostras de *responders* (tratadas com e sem lítio). Uma vez que estes resultados são baseados num baixo numero de amostras, a significância estatística é superior à desejada ($p > 0,05$), e devido a isto só se podem retirar conclusões preliminares. Talvez quando todos os resultados estiverem completos, se perceba que a

pequena diferença de expressão entre os *non responders/ responders* no fim de contas não é assim tão pequena.

A experiências deste projeto ainda estão a decorrer e muitas outras técnicas serão feitas, de forma a podermos correlacionar diferentes aspectos. O próximo passo será a validação do teste ELISA e assim será possível perceber se há uma relação entre a expressão de certos exões e a expressão de peptídeo.

O exão I não está representado aqui pois durante a cinética, surgiram problemas de detecção – à medida que a cinética avançava, o numero de amostras detectadas foi diminuindo. O exão V não foi expresso ao dia 4 e dia 8, mas ao dia 15 começou a ser detectada alguma expressão. Como foi mencionado acima, não é possível concluir nada uma vez que não há significância estatística e o numero de amostras é pequeno.

Conclusão

A DB é muito mais que uma desordem psiquiátrica, é uma desordem que atravessa barreiras económicas e sociais, que no fim de contas levam à exclusão dos indivíduos que padecem desta condição. A estabilização destes doentes com a medicação apropriada é de uma importância crítica. Como tal, é crucial que os médicos sejam capazes de identificar o mais rapidamente possível os responders e non responders (na prática clínica corrente), de forma a que a medicação possa ser ajustada.

Neste momento é ainda muito cedo para falar com certeza absoluta sobre os vários resultados, mas tenho a certeza que com o decorrer deste estudo, conclusões definitivas serão obtidas e assim se obterão mais informações sobre a resposta molecular ao lítio, o que num futuro próximo, assim o espero, ajudará a melhorar a qualidade dos cuidados aos doentes.

Alda, M., T. Hajek, C. Calkin and C. O'Donovan (2009). "Treatment of bipolar disorder: new perspectives." Ann Med **41**(3): 186-196.

Arnold, L. M. (2003). "Gender differences in bipolar disorder." Psychiatr Clin North Am **26**(3): 595-620.

Baastrup, P. C. and M. Schou (1967). "[Prophylactic action of lithium against recurrent depressions and manic-depressive psychosis]." Nord Med **77**(6): 180-187.

Belkai, E., J. M. Scherrmann, F. Noble and C. Marie-Claire (2009). "Modulation of MDMA-induced behavioral and transcriptional effects by the delta opioid antagonist naltrindole in mice." Addict Biol **14**(3): 245-252.

Cade, J. F. J. (1949). "Lithium Salts in the Treatment of Psychotic Excitement." Medical Journal of Australia **2**(10): 349-352.

Chen, Q. Y., Q. Chen, G. Y. Feng, C. L. Wan, K. Lindpaintner, L. J. Wang, Z. X. Chen, Z. S. Gao, J. S. Tang, X. W. Li and L. He (2006). "Association between the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene and schizophrenia in the Chinese population." Neurosci Lett **397**(3): 285-290.

Chiu, C. T. and D. M. Chuang (2010). "Molecular actions and therapeutic potential of lithium in preclinical and clinical studies of CNS disorders." Pharmacol Ther **128**(2): 281-304.

Chiu, C. T. and D. M. Chuang (2011). "Neuroprotective action of lithium in disorders of the central nervous system." Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban **36**(6): 461-476.

Chuang, D. M., R. W. Chen, E. Chalecka-Franaszek, M. Ren, R. Hashimoto, V. Senatorov, H. Kanai, C. Hough, T. Hiroi and P. Leeds (2002). "Neuroprotective effects of lithium in cultured cells and animal models of diseases." Bipolar Disord **4**(2): 129-136.

Cruceanu, C., M. Alda, G. Rouleau and G. Turecki (2011). "Response to treatment in bipolar disorder." Curr Opin Psychiatry **24**(1): 24-28.

Cruceanu, C., M. Alda and G. Turecki (2009). "Lithium: a key to the genetics of bipolar disorder." Genome Med **1**(8): 79.

Cunha, A. B. M., B. N. Frey, A. C. Andreazza, J. D. Goi, A. R. Rosa, C. A. Goncalves, A. Santin and F. Kapczinski (2006). "Serum brain-derived neurotrophic factor is decreased in bipolar disorder during depressive and manic episodes." Neuroscience Letters **398**(3): 215-219.

D'Addario, C., B. Dell'Osso, M. C. Palazzo, B. Benatti, L. Lietti, E. Cattaneo, D. Galimberti, C. Fenoglio, F. Cortini, E. Scarpini, B. Arosio, A. Di Francesco, M. Di Benedetto, P. Romualdi, S. Candeletti, D. Mari, L. Bergamaschini, N. Bresolin, M. Maccarrone and A. C. Altamura (2012). "Selective DNA methylation of BDNF promoter in bipolar disorder: differences among patients with BDI and BDII." Neuropsychopharmacology **37**(7): 1647-1655.

de Sousa, R. T., M. T. van de Bilt, B. S. Diniz, R. B. Ladeira, L. V. Portela, D. O. Souza, O. V. Forlenza, W. F. Gattaz and R. Machado-Vieira (2011). "Lithium increases plasma brain-derived neurotrophic factor in acute bipolar mania: a preliminary 4-week study." Neurosci Lett **494**(1): 54-56.

Fountoulakis, K. N., E. Vieta, M. Siamouli, M. Valenti, S. Magiria, T. Oral, D. Fresno, P. Giannakopoulos and G. S. Kaprinis (2007). "Treatment of bipolar disorder: a complex treatment for a multi-faceted disorder." Ann Gen Psychiatry **6**: 27.

Fukumoto, T., S. Morinobu, Y. Okamoto, A. Kagaya and S. Yamawaki (2001). "Chronic lithium treatment increases the expression of brain-derived neurotrophic factor in the rat brain." Psychopharmacology (Berl) **158**(1): 100-106.

Gama, C. S., A. C. Andreazza, M. Kunz, M. Berk, P. S. Belmonte-de-Abreu and F. Kapczinski (2007). "Serum levels of brain-derived neurotrophic factor in patients with schizophrenia and bipolar disorder." Neurosci Lett **420**(1): 45-48.

- Iwamoto, K., M. Bundo, S. Washizuka, C. Kakiuchi and T. Kato (2004). "Expression of HSPF1 and LIM in the lymphoblastoid cells derived from patients with bipolar disorder and schizophrenia." *J Hum Genet* **49**(5): 227-231.
- Judd, L. L., H. S. Akiskal, P. J. Schettler, J. Endicott, J. Maser, D. A. Solomon, A. C. Leon, J. A. Rice and M. B. Keller (2002). "The long-term natural history of the weekly symptomatic status of bipolar I disorder." *Arch Gen Psychiatry* **59**(6): 530-537.
- Lenox, R. H. and L. Wang (2003). "Molecular basis of lithium action: integration of lithium-responsive signaling and gene expression networks." *Mol Psychiatry* **8**(2): 135-144.
- Lohoff, F. W., T. Sander, T. N. Ferraro, J. P. Dahl, J. Gallinat and W. H. Berrettini (2005). "Confirmation of association between the Val66Met polymorphism in the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene and bipolar I disorder." *American Journal of Medical Genetics Part B-Neuropsychiatric Genetics* **139B**(1): 51-53.
- Machado-Vieira, R., H. K. Manji and C. A. Zarate, Jr. (2009). "The role of lithium in the treatment of bipolar disorder: convergent evidence for neurotrophic effects as a unifying hypothesis." *Bipolar Disord* **11 Suppl 2**: 92-109.
- Muller-Oerlinghausen, B., A. Berghofer and M. Bauer (2002). "Bipolar disorder." *Lancet* **359**(9302): 241-247.
- Oliveira, J. L., G. B. Silva Junior, K. L. Abreu, A. Rocha Nde, L. F. Franco, S. M. Araujo and F. Daher Ede (2010). "Lithium nephrotoxicity." *Rev Assoc Med Bras* **56**(5): 600-606.
- NIMH, Bipolar Disorder Booklet, 2008, Publication nº 09-3679 (acedido a 25 de Janeiro de 2012); disponível no site: <http://www.nimh.nih.gov/health/publications/bipolar-disorder/nimh-bipolar-adults.pdf>
- Pruunsild, P., A. Kazantseva, T. Aid, K. Palm and T. Timmusk (2007). "Dissecting the human BDNF locus: bidirectional transcription, complex splicing, and multiple promoters." *Genomics* **90**(3): 397-406.
- Salvadore, G., W. C. Drevets, I. D. Henter, C. A. Zarate and H. K. Manji (2008). "Early intervention in bipolar disorder, part II: therapeutics." *Early Interv Psychiatry* **2**(3): 136-146.
- Schou, M. (1967). "Therapeutic and prophylactic action of lithium against recurrent manic-depressive psychosis." *Act Nerv Super (Praha)* **9**(4): 440.
- Sie, L., S. Loong and E. K. Tan (2009). "Utility of lymphoblastoid cell lines." *J Neurosci Res* **87**(9): 1953-1959.
- Thase, M. E. (2006). "Pharmacotherapy of bipolar depression: an update." *Curr Psychiatry Rep* **8**(6): 478-488.
- Tighe, S. K., P. B. Mahon and J. B. Potash (2011). "Predictors of lithium response in bipolar disorder." *Ther Adv Chronic Dis* **2**(3): 209-226.
- Tseng, M., M. Alda, L. Xu, X. Sun, J. F. Wang, P. Grof, G. Turecki, G. Rouleau and L. T. Young (2008). "BDNF protein levels are decreased in transformed lymphoblasts from lithium-responsive patients with bipolar disorder." *J Psychiatry Neurosci* **33**(5): 449-453.
- Wheeler, H. E. and M. E. Dolan (2012). "Lymphoblastoid cell lines in pharmacogenomic discovery and clinical translation." *Pharmacogenomics* **13**(1): 55-70.
- Wolkowitz, O. M., J. Wolf, W. Shelly, R. Rosser, H. M. Burke, G. K. Lerner, V. I. Reus, J. C. Nelson, E. S. Epel and S. H. Mellon (2011). "Serum BDNF levels before treatment predict SSRI response in depression." *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **35**(7): 1623-1630.
- Young, L. T., R. T. Joffe, J. C. Robb, G. M. MacQueen, M. Marriott and I. Patelis-Siotis (2000). "Double-blind comparison of addition of a second mood stabilizer versus an antidepressant to an initial mood stabilizer for treatment of patients with bipolar depression." *Am J Psychiatry* **157**(1): 124-126.

Anexos

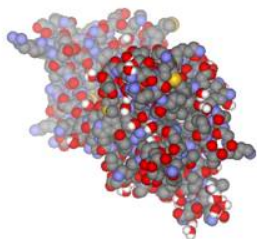


Fig. 1: Representação da proteína BDNF em seres humanos



Fig. 2: NanoDrop ND-1000



Fig. 3: Sistema de detecção 7900HT



Fig. 4: Chemidoc XRS