

**DANIELA VICENTE BAVARESCO**

**ALTERAÇÕES MITOCONDRIAIS EM LINFÓCITOS DE  
PACIENTES COM TRANSTORNO BIPOLAR DURANTE  
EPISÓDIO DEPRESSIVO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Ciências da Saúde para obtenção do  
título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Samira da  
Silva Valvassori  
Coorientador: Prof. Dr. João Luciano  
de Quevedo.

**CRICIÚMA  
2016**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

B353a Bavaresco, Daniela Vicente.  
Alterações mitocondriais em linfócitos de pacientes com transtorno bipolar durante episódio depressivo / Daniela Vicente Bavaresco ; orientadora : Samira da Silva Valvassori ; Coorientador : João Luciano de Quevedo. – Criciúma, SC : Ed. do Autor, 2016.  
76 p. : il.; 21 cm.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2016.

1. Transtorno bipolar. 2. Disfunção mitocondrial.  
3. Linfócitos. 4. Estresse oxidativo. 5. Cadeia respiratória mitocondrial. I. Título.

CDD. 22<sup>a</sup> ed. 616.895

Bibliotecária Eliziane de Lucca Alosilla – CRB 14/1101  
Biblioteca Central Prof. Eurico Back - UNESC



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC  
Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão.  
Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde  
**Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)**  
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria N° 1.919 de 03.06.2005

---

#### ATA DE MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – Nº 269

Com início às 09h00 (nove horas) do dia quinze do mês de fevereiro de 2017 (dois mil e dezessete), realizou-se, no Mini Auditório do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), o seminário formal de apresentação dos resultados da dissertação de Mestrado de **Daniela Vicente Bavaresco**, sob a orientação da Prof.ª Dra. Samira da Silva Valvassori, intitulada "**ALTERAÇÕES MITOCONDRIAIS EM LINFÓCITOS DE PACIENTES COM TRANSTORNO BIPOLAR DURANTE EPISÓDIO DEPRESSIVO**". A dissertação foi examinada por uma banca examinadora constituída pelos seguintes membros: Prof.ª Dra. Josiane Budni (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovada; Prof.ª Dra. Alexandra Ioppi Zugno (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovada e Prof.ª Dra. Luciane Bisognin Ceretta (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovada. Com o resultado final: **APROVADA**, a aluna finalizou seus estudos em nível de Mestrado, fazendo jus ao grau de **MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**. Os trabalhos foram concluídos às 10h00 (dez horas), dos quais eu, Diana Ghisi Daniel, Secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC, lavrei a presente ata, que assino juntamente com a Prof.ª Dra. Josiane Budni Coordenadora Adjunta do Programa. Criciúma, 15 (quinze) de fevereiro de 2017 (dois mil e dezessete).

  
Prof.ª Dra. Josiane Budni  
Coordenadora Adjunta do PPGCS

  
Diana Ghisi Daniel  
Secretária



A dissertação foi elaborada seguindo o estilo Vancouver e será apresentada no formato tradicional.

Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Neurociências do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da UNESC e no Ambulatório de Transtorno Bipolar localizado nas Clínicas Integradas da UNESC.

Parte do trabalho, no que diz respeito aos ensaios bioquímicos, foi realizada no Laboratório de Bioenergética do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da UNESC.



## **Agradecimentos**

Quero agradecer e dedicar este trabalho primeiramente a minha família e especialmente aos meus pais Ivânia e Carlos, que desde sempre acreditaram em mim, me apoiaram e tiveram paciência; só posso dizer que amo muito vocês. E agora meu marido Gustavo que aguenta minha ansiedade e preocupação extrema com meu trabalho e estudo, que confia e apoia meus sonhos desde a graduação.

Em especial minha orientadora Samira, sendo mais que uma professora, uma amiga que com firmeza e amor me conduziu nessa jornada. Desde seu mestrado mostrava sua paixão pela ciência e carinho pela docência, sempre com muito carinho compartilha seu vasto conhecimento com muita confiança e humildade. E agora é uma orientadora incrível.

Agradeço imensamente aos meus colegas bipolares, os pós-graduandos Roger, Wilson, Gustavo e Paula. Meu carinho especial aos alunos de iniciação científica (Bruna, Fernanda, Camila, Kerolen, amigo Luiz, Tamires, Karoliny).

Meu muito obrigada também a equipe de profissionais do Ambulatório de Transtorno Bipolar: Wilson, Luciano Jornada, Gustavo Feier, Rafael Riegel, Kelen Cechinel, Cenita Borges, Beatrice Niehues, Flavia Scussel e Bruna Pescador.

Aos professores do Neurotox: Emilio que teve papel fundamental no presente trabalho; Eduardo e Patrícia por todo carinho, apoio e ensinamentos.

Aos professores do Neurolab: Meu coorientador João Quevedo pela confiança de sempre, Josiane e Alexandra pela amizade.

Meu carinho especial aos colegas do Neurotox pelo convívio, parceria de todos os dias, chimarrão e toda a comilança.

Agradeço a UNESC e as Clinicas Integradas pelo espaço para o desenvolvimento da pesquisa.

Aos professores avaliadores Josiane, Alexandra e Luciane pela disponibilidade em participar da avaliação deste trabalho.

Aos voluntários que participaram deste estudo, sem eles nada seria possível.

A CAPES, CNPq e PPGCS-UNESC pelo apoio financeiro.

A todos meus sinceros agradecimentos





“Se não fôssemos perturbados por apreensões acerca de fenômenos no céu e a respeito da morte, se nada disso nos afetasse de um modo ou de outro, e também se não fôssemos perturbados por nosso fracasso em perceber os limites das dores e dos desejos, não teríamos necessidade alguma de estudar a natureza”

(Epicuro)



## RESUMO

Estudos sugerem que o transtorno bipolar (TB) está associado à disfunção mitocondrial e aumento do estresse oxidativo. O presente estudo tem como objetivo investigar os parâmetros de estresse oxidativo em mitocôndrias isoladas e atividade dos complexos mitocondriais em linfócitos de pacientes com TB durante episódios depressivos ou eutímicos. Este estudo avaliou os níveis de atividades dos complexos mitocondriais (I, II, II-III e IV) em linfócitos de pacientes com TB. Além disso, o presente estudo avaliou os seguintes parâmetros de estresse oxidativo: ânion radical superóxido, superóxido dismutase, espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e níveis de carbonila em partículas submitocondriais de linfócitos de pacientes bipolares. Nesse estudo foram incluídos 51 pacientes bipolares: 34 na fase eutímica e 17 na fase depressiva. As fases do transtorno bipolar foram definidas com base na Escala Young para Mania (YMRS) e Escala de Hamilton para Depressão (HDRS). Os resultados indicaram que os pacientes durante a fase depressiva apresentaram um aumento nos níveis submitocondriais de radical superóxido, de superóxido dismutase, de carbonila e de TBARS. Essas alterações nos parâmetros de estresse oxidativo foram acompanhadas pela diminuição da atividade do complexo II. Além disso, observou-se uma correlação negativa entre HDRS e complexo II nos linfócitos de pacientes depressivos bipolares. Houve uma correlação negativa entre a atividade do complexo II e parâmetros de estresse oxidativo. Ainda, foi observado uma correlação positiva entre HDRS e níveis de radical superóxido, superóxido dismutase, TBARS e carbonila. Os resultados do presente estudo sugerem que o estresse oxidativo mitocondrial e a disfunção do complexo mitocondrial II podem desempenhar papéis importantes na fase depressiva do TB.

**Palavras-chave:** Transtorno Bipolar; Depressão bipolar; Estresse oxidativo; Mitocôndria; Complexos da cadeia respiratória.



## ABSTRACT

There is an emerging body of data suggesting that bipolar disorder (BD) is associated with mitochondrial dysfunction and increased oxidative stress. The present study aims to investigate the oxidative stress parameters in isolated mitochondria and also mitochondrial complex activity in BD patients during depressive or euthymic episodes. This study evaluated the levels of mitochondrial complexes (I, II, II-III and IV) activities in lymphocytes from BD patients. In addition, it also evaluated the following oxidative stress parameters: superoxide, thiobarbituric acid reactive species (TBARS) and carbonyl levels in submitochondrial particles of lymphocytes from bipolar patients. Fifty-one bipolar patients were recruited: 34 in the euthymic phase and 17 in the depressive phase. The phases of bipolar disorder were defined based on the Young Mania Rating Scale (YMRS) and the Hamilton Depression Rating Scale (HDRS). Our results indicated that the depressive phase could increase the levels of mitochondrial superoxide, carbonyl and TBARS, and superoxide dismutase, and could decrease the levels of mitochondrial complex II activity in the lymphocytes of bipolar patients. It was observed that there was a negative correlation between HDRS and complex II in the lymphocytes of depressive bipolar patients. In addition, there was a positive correlation between HDRS and superoxide, superoxide dismutase, TBARS and carbonyl. Additionally, there was a negative correlation between complex II activity and oxidative stress parameters. Our results suggest that mitochondrial oxidative stress and mitochondrial complex II dysfunction play important roles in the depressive phase of BD.

**Key words:** Bipolar Disorder; Depression; Oxidative stress; Mitochondria; Respiratory chain complexes.



## SUMARIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
1.1 TRANSTORNO BIPOLAR .....	17
1.2 FARMACOTERÁPIA NO TRANSTORNO BIPOLAR .....	19
1.3 FISIOPATOLOGIA DO TRANSTORNO BIPOLAR .....	20
<b>1.3.1 Transtorno Bipolar e alterações mitocondriais</b> .....	<b>21</b>
<b>1.3.2 Estresse oxidativo no transtorno bipolar</b> .....	<b>24</b>
1.4 JUSTIFICATIVA .....	27
<b>2 OBJETIVOS DO TRABALHO</b> .....	<b>28</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	28
2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	28
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>29</b>
3.1 ASPECTOS ÉTICOS .....	29
3.2 TRIAGEM.....	29
<b>3.4.1 Entrevista Clínica Estruturada para o DSM-IV Transtornos do Eixo I - SCID – I</b> .....	<b>30</b>
<b>3.4.2 Escala Young para mania - YMRS</b> .....	<b>30</b>
<b>3.4.3 Escala de Hamilton para Depressão</b> .....	<b>30</b>
3.5 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO PARA PACIENTES .....	31
<b>3.5.1 Critérios de Inclusão para Pacientes</b> .....	<b>31</b>
<b>3.5.1 Critérios de Exclusão para Pacientes</b> .....	<b>31</b>
3.6 REGISTRO E ARMAZENAMENTO DE DADOS .....	31
3.7 ENSAIOS BIOQUÍMICOS .....	31
<b>3.7.1 Retirada de Sangue Periférico</b> .....	<b>31</b>
<b>3.7.2 Protocolo de Isolamento de Linfócitos a partir de Sangue Periférico</b> .....	<b>32</b>
<b>3.7.3 Atividades dos Complexos Enzimáticos da Cadeia Respiratória Mitocondrial</b> .....	<b>32</b>
<b>3.7.4 Avaliação de parâmetros de estresse oxidativo em partículas submitocondriais das células mononucleares do sangue periférico</b> .....	<b>33</b>
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	34
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>36</b>
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	<b>47</b>
<b>APÊNDICES</b> .....	<b>64</b>
APÊNDICE 1 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	65
<b>ANEXOS</b> .....	<b>66</b>
ANEXO 1 - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA UNESC .....	67
ANEXO 2 - ESCALA DE MANIA DE YOUNG .....	70
ANEXO 3 – ESCALA DE AVALIAÇÃO DE DEPRESSÃO DE HAMILTON .....	74





# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 TRANSTORNO BIPOLAR

O Transtorno Bipolar (TB) é um dos mais graves transtornos mentais e afeta a vida de milhões de pessoas em todo o mundo. É o terceiro transtorno psiquiátrico com maior impacto na qualidade de vida (QV) do paciente, ficando atrás da depressão e transtorno obsessivo compulsivo (Subramaniam et al., 2013). O TB é um transtorno psiquiátrico complexo, caracterizada por alterações do humor, compreendendo episódios maníacos ou hipomaníacos, depressivos e mistos (Judd et al., 2003; Kupka et al., 2007). A mania é caracterizada como humor expansivo ou irritável, autoestima inflada ou grandiosidade, redução da necessidade do sono, fuga de ideias, distratibilidade, agitação psicomotora, aumento da atividade sexual e presença de diversos comportamentos de risco. De acordo com o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais 5ª edição (DSM-5) a hipomania não é mais considerada uma condição ‘mais leve’ da mania, mas sim uma razão de tempo em que a pessoa passa por episódios maníacos em relação aos episódios depressivos. Já a depressão é caracterizada como humor deprimido, perda de interesse ou prazer, perda ou ganho de peso, insônia ou hipersonia, retardo psicomotor, fadiga, perda de energia, diminuição da concentração, indecisão e pensamento recorrente de morte (American Psychiatric Association, 2013).

O TB pode ser dividido em tipo I, tipo II, ciclotimia e sem outra especificação (SOE). TB do tipo I é principalmente caracterizado pela ocorrência de um ou mais episódios maníacos ou episódios mistos e um ou mais episódios depressivos ao longo da vida. Já o TB tipo II é caracterizado pela ocorrência de um ou mais episódios depressivos, acompanhados por pelo menos um episódio hipomaníaco. E por fim, o transtorno ciclotímico é envolvido por múltiplos períodos de sintomas maníacos ou hipomaníacos e de sintomas depressivos. Na ciclotimia, os sintomas maníacos/hipomaníacos e depressivos, tem gravidade, duração, número ou abrangência insuficiente para o diagnóstico do TB do tipo I ou do tipo II (American Psychiatric Association, 2013).

A presença de episódio maníaco/hipomaníaco é o marco no diagnóstico do TB. Entretanto, os episódios depressivos são tão incapacitantes quanto os maníacos e mais da metade dos pacientes apresentam episódio depressivo como quadro inicial (Barbosa e Teixeira, 2016). O episódio depressivo é o estado mais prevalente ao longo da vida do paciente bipolar e o tratamento para a depressão bipolar é um desafio

na prática clínica. Estes episódios no curso do TB apresentam vários problemas para o diagnóstico e o tratamento. Em muitos casos, a depressão maior e o TB serão diferenciados ao longo do curso dos transtornos. Assim, o uso de antidepressivos é controverso no TB, pois, podem desencadear um episódio maníaco, expondo o paciente aos riscos relacionados à ciclagem e, conseqüentemente, a piora da evolução do transtorno. Portanto, deve ser considerado o uso de antidepressivos associado com um estabilizador de humor ou um antipsicótico atípico, exigindo extrema atenção dos profissionais de saúde (Ghaemi et al., 2001; Cuellar et al., 2005; Schloesser et al., 2012; Alberich et al., 2016; Talaei et al., 2016).

Em relação à prevalência do TB durante a vida, Clemente e colaboradores (2015) demonstram em sua revisão sistemática e meta-análise estudos de 15 países. Neste estudo foi demonstrada uma prevalência de 1,06% para o TB tipo I e de 1,57% para o TB tipo II. No entanto, é difícil ter uma visão real desses números de uma forma mundial, pois a prevalência é muito diferente de um país para outro. A Índia, por exemplo, possui prevalência de 0,1% para este transtorno enquanto que os Estados Unidos de 4,4% (Merikangas et al., 2011). Já no Brasil a prevalência geral é de 2,1% (Magalhães et al., 2016). Diferenças essas que podem ser explicadas em parte pelos possíveis subdiagnósticos e diferentes instrumentos diagnósticos em diferentes países.

O TB está entre as condições médicas mais incapacitantes e por este motivo, tem sido visto como um problema de saúde pública mundial (Hyman et al., 2006). Segundo Magalhães e colegas (2016), os custos por incapacidade por motivo de episódios maníacos foi comparável ao câncer metastático e maior que a amputação de membros superiores e tuberculose. Talvez seja por isso que o TB também tem sido associado a altas taxas de desemprego (Magalhães et al., 2016). Deste modo, o TB se mostra um dos mais graves transtornos mentais, que apresenta alto impacto na vida do paciente, da sua família e da sociedade (Namjoshi e Buesching, 2001; Zendjidian et al., 2011).

A causa mais frequente de mortalidade no TB é o suicídio. Estudos demonstram que aproximadamente 60% dos pacientes bipolares do tipo I têm ideação suicida e que 29% desses já tentaram suicídio em algum momento de suas vidas. Geralmente, a ideação e a tentativa de suicídio ocorrem durante a fase depressiva do transtorno (Novick et al., 2010). Esse transtorno apresenta risco de suicídio de 20 a 30 vezes maior do que na população geral e a não adesão ao tratamento é um importante fator de risco de suicídio para esses pacientes (Bega et al., 2012; Pompili et al.,

2013). No entanto, para um grande número de pacientes, a farmacoterapia existente não é eficaz (Zarate et al., 2006; Yatham et al., 2013).

## 1.2 FARMACOTERÁPIA NO TRANSTORNO BIPOLAR

O tratamento farmacológico do TB é focado principalmente na fase aguda do transtorno, no qual o objetivo é tratar o paciente com mania/hipomania ou depressão, para a recuperação dos sintomas, levando-o a eutímia. Além disso, o tratamento de manutenção ou profilaxia é fundamental no TB para a prevenção de novos episódios, de mania/hipomania e/ou depressão. Além disso, o tratamento maximiza a recuperação funcional, ou seja, faz com que o paciente continue em remissão. Contudo, o tratamento de ambas as fases do transtorno pode ser de difícil manejo, porque antidepressivos podem causar mania/hipomania no paciente e os tratamentos que agem sobre os episódios maníacos, em alguns casos, podem levar a episódio depressivo (Geddes e Miklowitz, 2013).

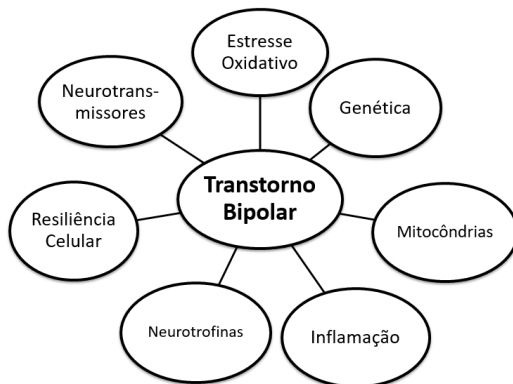
O único fármaco aprovado especificamente para o tratamento do TB é o lítio (Li), um estabilizador do humor, que foi lançado há mais de 50 anos no mercado. Desde a identificação dos efeitos antimaniacos do Li não foram desenvolvidos outros fármacos específicos para o tratamento do TB, que tenham uma ação precisa em ambos os polos do humor. Essa falta de tratamentos específicos para o TB exige o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas (Manji e Chen, 2002; Einat et al., 2003; Geddes e Miklowitz, 2013). Porém, outros fármacos podem ser utilizados para o tratamento deste transtorno, como os anticonvulsivantes e alguns antipsicóticos típicos e atípicos. Estes fármacos, juntamente com o Li, podem ser combinados para o tratamento agudo e o de manutenção do TB. Esses fármacos são utilizados principalmente no tratamento da fase maníaca. Entretanto, o tratamento da depressão bipolar, é considerado um desafio na prática clínica, pois, o uso de antidepressivos possui um risco muito grande no desencadeamento do episódio de mania. Levando em consideração que pacientes bipolares possuem danos graves que são acentuados a cada episódio do humor; a escolha da farmacoterapia para a depressão bipolar não depende somente do conhecimento sobre a eficácia do medicamento, mas também sobre os riscos associados (Ghaemi, et al., 2001; Haddad et al., 2009; Tohen e Vieta, 2009; Schloesser et al., 2012; Gama et al., 2016).

A farmacoterapia tem um papel decisivo no TB. No entanto, estudos têm demonstrado que 40% dos pacientes com TB em tratamento têm recaídas em um ano e em cinco anos o valor sobe para 73% (Kapczinski

et al., 2008; Valvassori, 2014; Neto e Carvalho, 2016). Esses dados demonstram que mesmo com tratamento adequada os pacientes com TB têm recorrência de episódios de humor, ou seja, mesmo em tratamento apropriado e boa adesão farmacológica, os pacientes com TB ainda podem ter novos episódios de humor. Como consequência desses episódios de humor recorrentes, pior será a evolução do TB, maior será a ocorrência de novos episódios, esses terão menores intervalos entre eles e conseqüentemente uma piora no funcionamento psicossocial (Kapczinski et al., 2008). Conseqüentemente, essa instabilidade pode levar a comorbidades com outros transtornos mentais, a sintomas residuais e a baixa adesão aos medicamentos, agravando o prognóstico do transtorno e elevando os custos com os serviços de saúde (Costa, 2008). A dificuldade para o desenvolvimento de novos fármacos para o TB está associada à falta de conhecimento sobre a precisa fisiopatologia desse transtorno (Lund et al., 2012).

### 1.3 FISIOPATOLOGIA DO TRANSTORNO BIPOLAR

A base biológica do TB tem sido considerada complexa, pois envolve múltiplos sistemas e multifatores (Figura 1). As causas ainda permanecem desconhecidas; entretanto, acredita-se que seja uma soma de vários fatores, tanto genéticos como ambientais, os quais interagem durante o neurodesenvolvimento, determinando a vulnerabilidade do indivíduo ao transtorno (Rizzo et al., 2014). A fisiopatologia do TB é complexa, sua identificação tem se mostrado um desafio (Rajkowska, 2002).



**Figura 1.** Esquema ilustrativo das principais alterações investigadas na fisiopatologia do transtorno bipolar. Atualmente os estudos sobre a neurobiologia do TB têm focado principalmente em alterações genéticas, mitocondriais, em

sistemas inflamatórios, em níveis de neurotrofinas, em resiliência celular, neurotransmissão e aumento de estresse oxidativo. Não apenas em alterações monoaminérgicas. (Adaptado de Fries et al., 2016).

Em suma, na tentativa de compreender o TB, estudos mostraram que os mecanismos moleculares, celulares e comportamentais interagem com genes de suscetibilidade, estressores ambientais e mecanismos bioquímicos (Berk et al., 2011). Esses mecanismos por sua vez, promovem efeitos deletérios que contribuem para inflamação exacerbada e estresse oxidativo, disfunções mitocondriais e de retículo endoplasmático, vias de apoptose e neurogênese interrompidas (Kato e Kato, 2000; Konradi et al., 2004; Clay et al., 2011; Gigante et al., 2011; Pfaffenseller et al., 2014). Estudos sugerindo também a desregulação de múltiplos sistemas neurais (Rajkowska, 2002; Biellau et al., 2007; Pinsonneault et al., 2011).

Estudos têm fortemente sugerido o envolvimento de danos mitocondriais no TB, como alterações nos complexos da cadeia respiratória (Kato e Kato, 2000; Konradi et al., 2004; Morris e Berk, 2015; Scaini et al., 2016) e aumento de estresse oxidativo (Kapczinski et al., 2011; Andrezza et al., 2010). E a disfunção mitocondrial como um dos principais responsáveis pelo aumento do estresse oxidativo (Orrenius et al., 2007; Andrezza et al., 2010; Clay et al., 2011; Gubert et al., 2013; Scaini et al., 2016).

### **1.3.1 Transtorno Bipolar e alterações mitocondriais**

A mitocôndria é uma organela responsável por produzir energia para todas as atividades celulares. No interior das mitocôndrias ocorre a respiração celular. A energia liberada na respiração celular é armazenada em forma de ATP (adenosina trifosfato), que se difunde para todas as regiões da célula, fornecendo energia para as mais diversas atividades celulares. As mitocôndrias têm um papel essencial no metabolismo celular e também estão envolvidas na modulação dos níveis de cálcio celular ( $Ca^{2+}$ ), são fontes de substratos de crescimento celular e desempenham um papel crucial no estresse oxidativo/nitrosativo e nas vias de resiliência e morte celular (Pieczenik e Neustadt, 2007; Niizuma et al., 2010; Soeiro-de-Souza et al., 2014).

Na matriz mitocondrial acontece o ciclo de Krebs, que fornece NADH e FADH<sub>2</sub>, para a cadeia transportadora de elétrons que finalmente ocorre a produção de energia em forma de ATP (Velot e Srere, 2000). A cadeia respiratória é composta por cinco complexos (I, II, III, IV e V). O

complexo I - também chamado de NADH; O complexo II - também denominado de succinato; O complexo III - ou citocromo c oxirredutase; O complexo IV - mais conhecido como citocromo c oxidase; e finalmente o gradiente eletroquímico formado pelo bombeamento de prótons durante a cadeia respiratória mitocondrial é utilizado como força-motriz para o complexo V - ou ATP sintase – para formar ATP (fosforilação oxidativa). O ATP é transportado para fora da mitocôndria com o concomitante transporte de ADP para dentro desta organela, através de um sistema antiporte (Voet e Voet, 1995; Heales et al., 1999; Wallace, 1999; Nelson e Cox, 2000).

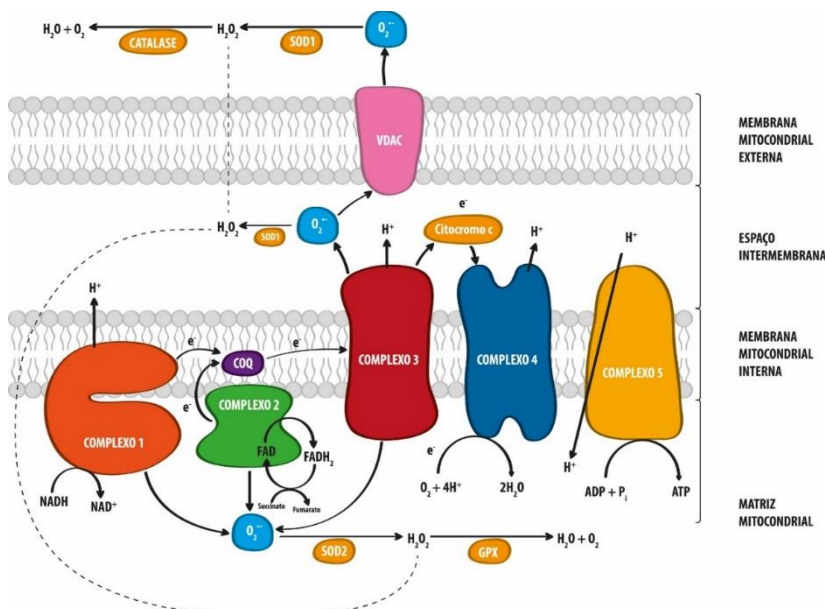
A mitocôndria possui um papel importante na função neuronal. Os neurônios, assim como os músculos, têm membrana excitável, a qual permite a entrada de íons do meio extracelular por uma grande variedade de canais. Assim, o neurônio demanda alta quantidade de energia para manter o equilíbrio intracelular de íons contra o gradiente de concentração (Nicholls e Budd, 2000). Assim, a disfunção mitocondrial não só prejudica a produção de energia, mas afeta também importantes funções neuronais (Palmer et al., 2011).

Vários estudos sugerem que o TB está relacionado a disfunções mitocondriais (Kato e Kato, 2000; Konradi et al., 2004; Quiroz et al., 2008; Andrezza et al., 2010; Soeiro-de-Souza et al., 2014). A diminuição da função mitocondrial com conseqüente prejuízo no metabolismo energético celular é uma das hipóteses na explicação da fisiopatologia do TB. Um estado energético celular irregular pode levar à perda da função e da plasticidade neuronal (Steckert et al., 2010).

A hipótese da disfunção mitocondrial no TB foi inicialmente proposta por Kato e Kato (2000). Estudos tem mostrado significativa diminuição da atividade da cadeia respiratória mitocondrial (Andrezza et al., 2010). Yuksel e colaboradores (2015) demonstraram que pacientes bipolares têm níveis mais baixos de ATP, quando comparados a controles saudáveis. Outro estudo clínico, utilizando Fósforo-31 com espectroscopia de ressonância magnética de imagem em adolescentes não medicados com diagnóstico de TB tipo I comparados com controles saudáveis, mostraram que níveis de fosfocreatina (PCr do inglês *phosphocreatine*) e ATP em cérebro de pacientes bipolares em comparação com controles foram significativamente menores, sugerindo que a deficiência bioenergética relacionada à disfunção mitocondrial pode desempenhar um papel importante na fisiopatologia e progressão do TB (Dudley et al., 2015). Níveis anormais de PCr geralmente indicam

acentuadas alterações no metabolismo celular, em particular, na insuficiência de ATP (Wyss e Schulze, 2002).

Estudos tem fortemente sugerido uma ligação entre disfunção mitocondrial e dano oxidativo em proteína, lipídeo e DNA, também observados no TB (Machado-Vieira et al., 2007; Kunz et al., 2008; Andrezza et al., 2010; Gubert et al., 2013; Morris e Berk, 2015). Os complexos geram uma força motriz através da passagem dos elétrons pelos complexos da cadeia respiratória mitocondrial, para a formação de ATP no complexo V. No entanto, com transferência de elétrons entre os complexos, podem ocorrer a liberação desses elétrons nos complexos I, II ou III, gerando espécies reativas de oxigênio (Erro) (Figura 2) (Orrenius et al., 2007; Koopman et al., 2010). A disfunção da cadeia respiratória mitocondrial pode levar a produção excessiva de ERO. O excesso de ERO pode desencadear reações intracelulares que levam a um aumento na liberação de citocromo c, o qual ativa a pro-caspase-3, que por sua vez ativa a caspase-9, ativando a cascata apoptótica (Adam-Vizi e Chinopoulous, 2006). Outra rota de ativação de apoptose é via p53, induzida por dano ao DNA, com consequente ativação da Bax e liberação do citocromo c pela mitocôndria (Adams e Cory, 2007).



**Figura 2.** O desenho mostra os complexos da cadeia respiratória mitocondrial, que é composta por cinco complexos (I, II, III, IV e V). Desenho esquemático da

formação de ânion radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) durante a fosforilação oxidativa. A figura demonstra a ação das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD)1, SOD2, glutatona peroxidase (GPx) e catalase (CAT). A SOD2 age sobre a molécula de  $O_2^{\cdot-}$  na matriz mitocondrial, produzindo peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), enquanto que a GPx age sobre o  $H_2O_2$ , produzindo  $H_2O$  e  $O_2$ . A SOD1 age sobre o  $O_2^{\cdot-}$  produzindo  $H_2O_2$  no espaço intermembrana e no citosol. A CAT age sobre o  $H_2O_2$  no citosol, produzindo  $H_2O$  e  $O_2$ . O  $O_2^{\cdot-}$  pode atravessar a membrana externa mitocondrial através de um canal iônico dependente de voltagem (VADC) e o  $H_2O_2$  tem livre acesso as membranas mitocondriais, como pode ser observado pelas linhas pontilhadas do desenho (Adaptado de Valvassori et al., 2014).

A disfunção mitocondrial pode ser responsável por 90% dos ERO endógeno (Scaini et al., 2016). As mitocôndrias ocupam um papel central no ciclo de vida-morte celular, elas podem servir como alvo potencial para a modulação farmacológica (Scaini et al., 2016). Juntos esses estudos podem explicar, ao menos em parte, a redução no volume de algumas regiões do cérebro, que é acompanhada pela atrofia e perda celular, vista em pacientes com TB (Drevets, 2001; Manji e Duman, 2001).

### 1.3.2 Estresse oxidativo no transtorno bipolar

As ERO, as espécies reativas de nitrogênio (ERN), entre outras espécies reativas, são parte integrantes do metabolismo humano e estão presentes em diversas condições fisiológicas (Vasconcelos et al., 2007). No entanto quando sua produção é acentuada, sistema antioxidante não consegue manter o equilíbrio com o sistema oxidante e assim levava a uma condição de estresse oxidativo. O termo estresse oxidativo refere-se a um desequilíbrio entre a geração de espécies reativas e as defesas antioxidantes, ou seja, um desequilíbrio entre pró-oxidantes e antioxidantes (Halliwell, 2007). Portanto, o aumento da produção de ERO e ERN ou alterações de mecanismos antioxidantes podem levar ao dano de componentes celulares, tais como DNA, proteínas e lipídeos (Machado-Vieira et al., 2007; Andreazza et al., 2009).

Algumas das ERO são radicais livres, enquanto outras são agentes oxidantes não radicalares, como por exemplo, o peróxido de hidrogênio. Dentre as ERO, o radical superóxido e radical hidroxila são classificados como radicais livres de oxigênio porque apresentam um elétron desemparelhado em sua estrutura atômica. Os radicais livres, por possuírem um ou mais elétrons desemparelhados, são as espécies mais reativas (Halliwell e Gutteridge, 1989). O radical hidroxila é a ERO mais



potente e, conseqüentemente, é o que causa maior dano nos sistemas biológicos, devido ao seu tempo de vida extremamente curto ( $1 \times 10^{-9}$ s) e de sua alta reatividade com uma grande variedade de moléculas orgânicas (Yu, 1994). Além de ser produzido durante a fosforilação oxidativa, o radical hidroxila, pode, ser formado por duas diferentes vias alternativas em organismos vivos, pela reação de Fenton e pela reação de Haber-Weiss (Haber e Weiss, 1934; Halliwell e Gutteridge, 1990), como demonstrado na Figura 3:

Reação de Fenton:



Reação de Haber-Weiss:



**Figura 3.** Reação de Fenton e reação de Haber-Weiss. A reação de Fenton é o nome dado à oxidação de  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$  pelo  $\text{H}_2\text{O}_2$ , uma reação que produz espécies com alto poder oxidante como o  $\text{OH}^\cdot$ . Outra reação que gera o radical  $\text{OH}^\cdot$  é a reação de Haber-Weiss, que é catalisada por metais de transição como o Ferro e o Cobre. (Adaptado de Valvassori et al., 2014).

Esse sistema de proteção antioxidante pode ser enzimático ou não enzimático, e ambos trabalham em conjunto para minimizar os efeitos das ERO nos tecidos. O sistema antioxidante enzimático inclui a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a glutathione peroxidase (GPx), a glutathione redutase (GR) e a glutathione S-transferase (GST) (Chance et al., 1979; Yu, 1994; Barbosa et al., 2010). E esse sistema de defesa tem a função de inibir e/ou reduzir os danos causados pela ação deletéria dos radicais livres e/ou espécies reativas não radicais (Yu, 1994; Halliwell, 2006).

Essas substâncias citotóxicas podem também ser originadas através de reações enzimáticas, de reações de auto-oxidação ou ainda pelo grupo heme de algumas proteínas. Cerca de 1-2% do oxigênio consumido durante a fosforilação oxidativa é convertido em ânion radical superóxido, quando elétrons são liberados da cadeia de transporte de elétrons e são acidentalmente transferidos para o oxigênio molecular (Orrenius et al., 2007). No entanto, sob condições metabólicas ou de estresse específicos, uma quantidade ainda maior de elétrons podem ser

liberados da cadeia respiratória, aumentando ainda mais a geração de ânion radical superóxido mitocondrial. Esta liberação acidental de elétrons ocorre nos complexos I, II ou III (Orrenius et al., 2007; Koopman et al., 2010).

Além de ERO, as ERN, também pode induzir danos a biomoléculas. As ERN têm como principais representantes o óxido nítrico e o peroxinitrito (Pero et al., 1990; Davies 1995; Sarkar e Bhaduri, 2001; Bowler e Crapo, 2002). A interação do óxido nítrico com o ânion radical superóxido produz o peroxinitrito, o qual é capaz de se decompor produzindo potentes oxidantes em pH fisiológico. Ao contrário da maioria das ERO e a exemplo do radical hidroxila, o óxido nítrico, bem como o peroxinitrito, não possuem uma enzima antioxidante específica, sendo suas concentrações reguladas pelos níveis de antioxidantes não enzimáticos e, principalmente, pelas concentrações de ânion radical superóxido disponíveis (Rao et al., 1992; Kooy et al., 1997). Os danos induzidos pela nitração da tirosina, embora significativos, são menos agressivos quando comparados com os danos provocados pela carbonilação de proteínas (Irie et al., 2003; Osoata et al., 2009).

Estudos clínicos tem fortemente sugerido o envolvimento do estresse oxidativo no TB (Halliwell, 2006; Andrezza et al., 2009; Berk et al., 2011). Níveis elevados de peroxidação lipídica e dano a proteínas, através, da técnica de TBARS e formação de agrupamento de proteínas carbonila, tem sido observado no sangue de pacientes com TB, quando comparado com controles saudáveis (Andrezza et al., 2009; Kapczinski et al., 2011; Pedrini et al., 2012). Estudos *postmortem* tem demonstrado níveis elevados de dano a proteínas e lipídeos em córtex pré-frontal de pacientes bipolares (Wang et al., 2009; Andrezza et al., 2010; Andrezza et al., 2013). Além disso, o sistema de defesa antioxidante também parece estar alterado no TB, até mesmo em estágios iniciais do transtorno. Andrezza e colegas (2009) evidenciaram um aumento de glutathione, tanto de GST quanto de GR, no sangue de bipolares em estágios iniciais do transtorno. A enzima antioxidante SOD também foi encontrada aumentada no sangue de pacientes bipolares, durante episódios de mania e de depressão (Kunz et al., 2008).

O estresse oxidativo pode ser detectado nas fases iniciais do TB, eles tendem a ser mais pronunciados com o passar do tempo do transtorno ou o número de episódios, sugerindo que o estresse oxidativo pode ser um mecanismo de neuroprogressão e uma fonte de biomarcadores de plasma para monitorar o curso da doença (Berk et al., 2011; Magalhães et al., 2012; Rizzo. et al., 2014).

## 1.4 JUSTIFICATIVA

Os transtornos neuropsiquiátricos, que incluem distúrbios neurológicos e psiquiátricos, são responsáveis por 13% da carga global de doenças. Dentre eles, a depressão maior e o TB possuem um número bastante representativo de pacientes. Entretanto, apesar de sua gravidade ainda existe uma lacuna muito grande entre o tratamento desses transtornos e a eficácia terapêutica de antidepressivos e estabilizadores de humor (Lund et al., 2012). O TB é um dos mais severos transtornos e que afeta a vida de milhões de pessoas em todo o mundo. É o terceiro transtorno psiquiátrico com maior impacto na qualidade de vida do paciente, ficando atrás da depressão e transtorno obsessivo compulsivo (Subramaniam et al, 2013).

A precisa neurobiologia do TB ainda é desconhecida e vários grupos de pesquisa têm tentado descobrir novos biomarcadores para este transtorno. A descoberta de novos biomarcadores para o TB poderia ajudar tanto no diagnóstico quanto no desenvolvimento de novos estabilizadores de humor. Diversos estudos clínicos e pré-clínicos sugerem que o estresse oxidativo e alterações na cadeia respiratória mitocondrial desempenham um importante papel na fisiopatologia de TB (Machado-Vieira et al., 2007; Kunz et al., 2008; Andreatza et al., 2009; Yumru et al., 2009; Andreatza et al., 2010).

## **2 OBJETIVOS DO TRABALHO**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar as alterações mitocondriais em linfócitos de pacientes com TB durante episódio de depressão ou eutímia.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- Avaliar a atividade dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial (complexos I, II, II-III e IV) em linfócitos de pacientes com transtorno bipolar, durante episódio de depressão ou eutímia;

- Avaliar a produção de ânion radical superóxido, a atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD), níveis de grupamentos carbonila, de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e a nitração de proteínas através de quantificação de 3-nitrotirosina em partículas submitocondriais em linfócitos de pacientes com transtorno bipolar, durante episódio de depressão ou eutímia.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 ASPECTOS ÉTICOS

A entrevista diagnóstica e coleta de amostra de sangue periférico foram realizadas após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (APÊNDICE 1). Não houve conflito de interesses entre os pesquisadores envolvidos e os achados da pesquisa. A presente pesquisa teve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC) pelo número do protocolo 16/2010 (ANEXO 1).

Foram avaliados 51 pacientes com TB tipo I, 34 estavam em episódio eufímico e 17 estavam em episódio deprimido. Os pacientes foram recrutados nas Clínicas de Psiquiatria e de Psicologia das Clínicas Integradas da UNESC e no Ambulatório de Psiquiatria da Prefeitura Municipal de Criciúma. Além disso, foram realizados anúncios em mídia (rádios, jornais e internet) na região da AMREC de Santa Catarina, Brasil. Os dois grupos foram pareados por gênero, idade atual, idade do primeiro episódio e idade em que foi feito o diagnóstico.

As triagens, aplicação das escalas e retirada de sangue foram realizadas nas Clínicas Integradas da UNESC, no Ambulatório de Transtorno Bipolar. O armazenamento das amostras de sangue coletados e posterior análise foram realizadas no Laboratório de Neurociências e Laboratório de Bioenergética, também na UNESC.

#### 3.2 TRIAGEM

Após a assinatura do TCLE, a avaliação diagnóstica foi realizada através da Entrevista Clínica Estruturada para Transtornos do Eixo I do DSM-IV (SCID-I). As fases do transtorno bipolar foram definidas com base em Escala Young para Mania (do inglês *Young Mania Rating Scale - YMRS*) (ANEXO 2) e Escala de Hamilton para Depressão (do inglês *Hamilton Depression Rating Scale - HDRS*) (ANEXO 3). Após a triagem, amostras de sangue foram coletadas por venopunção da região antecubital para as dosagens bioquímicas propostas.

As pontuações de corte utilizadas no estudo foram: YMRS > 12 como um indicativo de mania e HDRS > 7 como um indicativo de depressão. Os pacientes foram divididos em dois grupos como segue: pacientes eufímicos que pontuaram HDRS < 7 e YMRS < 12; E pacientes depressivos bipolares que pontuaram HDRS > 7 e YMRS < 7. Os pacientes em fase mista foram excluídos.

### **3.4.1 Entrevista Clínica Estruturada para o DSM-IV Transtornos do Eixo I - SCID – I**

A Entrevista Clínica Estruturada para o DSM-IV (SCID-IV), traduzida e adaptada para o português por Cristina Marta Del Bem, Antônio Waldo Zuardi, José Antônio Alves Vilela e José Alexandre de Souza Crippa que se caracterizam como um instrumento utilizado para a elaboração de diagnósticos clínicos psiquiátricos fundamentados no DSM-IV. A SCID–I é dividida em módulos que obedecem às categorias diagnósticas maiores. Os critérios diagnósticos estão presentes no próprio corpo do instrumento, promovendo a elaboração do diagnóstico conforme a entrevista progride (Del-Ben, 2001).

### **3.4.2 Escala Young para mania - YMRS**

A YMRS é uma das escalas de avaliação mais utilizadas para avaliar sintomas maníacos. A escala tem onze itens e é baseado no relato subjetivo do paciente, de sua condição clínica nas últimas 48 horas. Informação adicional baseia-se em observações clínicas efetuadas durante o decurso da entrevista clínica. Os itens são selecionados com base em descrições publicadas dos principais sintomas de mania. Foi utilizado como ponto de corte o escore doze, onde, maior que doze considerou-se um indicativo de mania do paciente e menor ou igual a doze um indicativo de o paciente não estava em mania (Beigel et al., 1971; Vilela et al., 2005).

### **3.4.3 Escala de Hamilton para Depressão**

Foi desenvolvida e elaborada por Hamilton no final da década de 50, atualmente é utilizado no mundo todo e é considerada “padrão ouro” na avaliação da depressão. Possui 21 itens com perguntas relacionadas a humor, sentimentos, suicídio, insônia, sintomas, trabalhos e atividades, sendo mensuradas em escores. Foi utilizado como ponto de corte o escore sete, sendo maior que sete um indicativo de humor deprimido e maior ou igual a sete o paciente não apresentava humor deprimido (Neto et al., 2001).

### 3.5 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO PARA PACIENTES

#### 3.5.1 Critérios de Inclusão para Pacientes

(a) Ser acometido pelo Transtorno Bipolar do Humor Tipo I, II com episódio atual maníaco, depressivo ou eutímico, de acordo com o SCID-I (DSM-IV);

(b) Paciente com idade a partir de 18 anos;

(c) Capacidade do paciente ou, em casos mais severos, do familiar responsável em fornecer o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice-1).

#### 3.5.1 Critérios de Exclusão para Pacientes

(a) Negar-se em fornecer o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido;

(b) Negar-se a coletar a amostra de sangue periférico;

### 3.6 REGISTRO E ARMAZENAMENTO DE DADOS

Os dados dos pacientes foram registrados nos documentos próprios do projeto de pesquisa, também foram registrados a presença e participação na pesquisa no prontuário das Clínicas Integradas da UNESC. Os documentos da pesquisa foram armazenados em armários chaveados com acesso somente aos pesquisadores diretamente ligados ao projeto.

### 3.7 ENSAIOS BIOQUÍMICOS

#### 3.7.1 Retirada de Sangue Periférico

Amostra de sangue periférico num volume de 30 ml foram coletadas dos pacientes por venopunção da região antecubital do braço direito ou esquerdo. As amostras foram homogeneizadas em tampão correspondente à técnica a ser utilizada e armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . A proteína foi determinada pelo método de Lowry e colaboradores (1951) usando albumina sérica bovina como padrão.

Após a coleta foi fornecido aos pacientes um lanche leve (bolos e bolachas) acompanhado por líquido (sucos e chás) para auxiliar na reidratação e elevar o nível glicêmico.

### **3.7.2 Protocolo de Isolamento de Linfócitos a partir de Sangue Periférico**

O sangue foi obtido através de uma punção venosa, usando seringas heparinizadas. As amostras foram refrigeradas à  $-80^{\circ}\text{C}$  para serem processadas em até oito horas após a coleta. As células mononucleares de sangue periférico (PBMC – do inglês: Peripheral blood mononuclear cells) foram isoladas utilizando centrifugação em gradiente de densidade Ficoll-Paque (GE Healthcare, USA). As células mononucleares de sangue periférico foram isoladas utilizando centrifugação em gradiente de densidade Ficoll-Paque, de acordo com as instruções do fabricante. Foi adicionada solução tampão fosfato (PBS) na suspensão PBMC resultante, contendo principalmente linfócitos, e centrifugada a 1300 RPM durante 10 minutos. O sobrenadante foi removido e o sedimento foi ressuspenso em PBS (este procedimento foi repetido duas vezes). Após foi o sedimento foi centrifugado a 1200 RPM durante 5 minutos e o sobrenadante foi removido e o sedimento foi alocado a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior análise (Boyum, 1976).

### **3.7.3 Atividades dos Complexos Enzimáticos da Cadeia Respiratória Mitocondrial**

A partir das PBMC foi avaliada a atividade dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial. A atividade do complexo I é avaliada pelo método descrito por Cassina e Radi (1996) pela taxa de NADH-dependente da redução do ferricianeto a 420 nm. A atividade do complexo II foi medida pelo método descrito por Fischer et al. (1985), em que a diminuição da absorbância do 2,6-DCIP em 600 nm é usada para o cálculo da atividade do complexo II. A atividade do complexo III é determinada de acordo com Fischer et al. (1985) e é baseada na redução do citocromo c acompanhada em 550 nm a  $37^{\circ}\text{C}$ . A reação é iniciada pela adição de decilubiquinol e o aumento na absorbância em 550 nm durante 3 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ , devido à redução do citocromo c, é acompanhado. Após 3 minutos é acrescentada antimicina A ( $3\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ) e a absorbância é acompanhada durante outros 3 minutos. A atividade do complexo II-III é determinada como atividade sensível à antimicina. A atividade do complexo IV foi determinada de acordo com Rustin et al. (1994), e é calculada pela diminuição da absorbância causada pela oxidação do citocromo c reduzido, medido em 550 nm.



### **3.7.4 Avaliação de parâmetros de estresse oxidativo em partículas submitocondriais das células mononucleares do sangue periférico**

#### *3.7.4.1 Protocolo de Isolamento Mitocondrial*

A partir das PBMC foram isoladas as partículas submitocondriais. Os PBMC foram centrifugadas a 700g durante 10 minutos para eliminar os núcleos e os resíduos celulares e o sedimento foi lavado para enriquecer o sobrenadante que foi centrifugado a 7000g durante 10 min. O sedimento obtido, lavadas e ressuspensas no mesmo tampão, foram considerados como consistindo principalmente de mitocôndrias intactas capaz de realizar a fosforilação oxidativa. As operações foram realizadas a 0-2°C. Partículas submitocondriais (SMP) foram obtidos por congelamento e descongelamento (três vezes) de mitocôndrias isoladas. Para medições a produção de superóxido, PMS foram lavadas duas vezes com 140 mM KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7,4) e suspensas no mesmo meio (Boveris et al., 1972).

#### *3.7.4.2 Produção de ânion radical superóxido em partículas submitocondriais das células mononucleares do sangue periférico*

A produção de radical superóxido foi determinada em partículas submitocondriais das células mononucleares do sangue periférico utilizando um ensaio espectrofotométrico baseado na oxidação dependente de superóxido de adrenalina a adrenocromo a 37°C (480 nm = 4,0 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>). O meio reacional consiste em manitol 0,2 M, sacarose 0,07 M, HCl 20 mM (pH 7,4), SMP (0,3-1,0 mg proteína / ml), catalase 0,1 M e adrenalina 1 mM. Utilizaram-se NADH (50 M) e succinato (7 mM) como substratos para ensaiar a produção de O<sup>-2</sup> (Boveris, 1984).

#### *3.7.4.3 Superóxido dismutase em partículas submitocondriais das células mononucleares do sangue periférico*

A partir das partículas submitocondriais das PBMC foi avaliada a atividade superóxido dismutase. A atividade da SOD foi definida como a capacidade do pirogalol de se auto-oxidar, em um processo altamente dependente de O<sub>2</sub><sup>-2</sup>; um substrato para SOD (Bannister e Calabrese, 1987). Resumidamente, a presença de SOD influencia a inibição da autooxidação de pirogalol, assim a atividade enzimática pode ser testada indiretamente. A atividade foi realizada num espectrofotômetro de duplo feixe (420 nm). Além disso, para definir a curva padrão de calibração,

utilizou-se SOD purificado. Os valores de atividade de SOD foram expressos como unidades por mg de proteína e 1 unidade de SOD é definida quando existe uma autoxidação de 50% de pirogalol.

#### *3.7.4.4 Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em partículas submitocondriais das células mononucleares do sangue periférico*

Como um marcador de peroxidação lipídica, medimos a formação de TBARS durante uma reação de aquecimento de ácido, conforme descrito anteriormente (Esterbauer e Cheeseman, 1990). Resumidamente, as amostras foram misturadas com 1 ml de ácido tricloroacético a 10% e 1 ml de ácido tiobarbitúrico a 0,67%, e depois aquecidas num banho de água a ferver durante 15 min. As TBARS foram determinados pela absorvância a 535 nm.

#### *3.7.4.5 Produção de grupamentos carbonila em partículas submitocondriais das células mononucleares do sangue periférico*

O dano oxidativo às proteínas foi medido pela quantificação de grupamentos carbonila com base na reação com dinitrofenilhidrazina (DNPH), conforme descrito anteriormente (Levine et al., 1994). As proteínas foram precipitadas pela adição de ácido tricloroacético a 20% e dissolvidas em DNPH; A absorvância foi lida a 370 nm.

#### *3.7.4.6 3-nitrotrosina em partículas submitocondriais das células mononucleares do sangue periférico*

A nitração de proteínas foi analisada através de quantificação de 3-nitrotrosina (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA kit Abcam, ab116691). Após uma breve incubação da amostra em uma placa, um anticorpo anti-nitrotirosina é adicionado, seguido por um anticorpo secundário conjugado com HRP. A quantidade de nitrotirosina presente na amostra foi determinada pela comparação com uma curva padrão.

### 3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados utilizando o software Statistical Package for Social Sciences (SPSS), versão 22.0 (IBM Corporation, Armonk, NY, EUA). A normalidade da distribuição de dados foi avaliada utilizando o

teste de Shapiro-Wilk. Para identificar as diferenças entre os grupos (pacientes depressivos *versus* pacientes eutímicos) nos parâmetros bioquímicos, idade, idade de diagnóstico, índice de massa corporal, pontuação HDRS e pontuação YMRS foi utilizado o teste t de Student para amostras independentes. As diferenças nos medicamentos utilizados pelos pacientes, tabagismo e comorbidades foram avaliadas pelo teste exato de Fisher. As correlações foram analisadas utilizando o teste de Pearson. O coeficiente de correlação de Pearson foi utilizado para analisar a força da relação entre as variáveis contínuas. Diferença considerada significativa com valor de  $P < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS

As características clínicas dos pacientes estão na Tabela 1. Todos os grupos foram homogêneos quanto à idade e ao sexo, no entanto a amostra foi composta em sua maioria por mulheres (76,5%). Não houve diferença estatisticamente significativa entre as fases do TB em termos de idade do primeiro episódio, idade do diagnóstico, tempo de progressão do transtorno, *delay* do diagnóstico (anos), tabagismo atual, medicações em uso, comorbidades e escore do YMRS. Os dados com diferença estatística foram na HDRS ( $t=2,308$ ,  $df=49$ ,  $p=0,025$ ), indicando a presença de humor deprimido em 17 pacientes bipolares. Além disso, os pacientes depressivos tinham um índice de massa corporal significativamente maior do que os pacientes eutímicos ( $t=2,082$ ,  $df = 49$ ,  $p=0,043$ ).

**Tabela 1 – Características dos pacientes**

Características	Pacientes bipolares		Valor de p
	Eutímicos (n =34 )	Depressivos (n = 17)	
Homens, n (%) <sup>a</sup>	8 (23,5)	4 (23,5)	1
Mulheres, n (%) <sup>a</sup>	26 (76,5)	13 (76,5)	
Idade, média ± DP <sup>b</sup>	44 ±12,09	46,59 ±11,1	0,473
Idade do primeiro episódio, MDN (IQR) <sup>a</sup>	23,00(17,00-34,75)	23,00(16,50-28,75)	0,696
Idade do diagnóstico, média ± DP <sup>b</sup>	36,29 ± 12,48	34,75 ± 9,31	0,627
Tempo de progressão do transtorno, MDN (IQR) <sup>a</sup>	13,50(6,50-26,25)	22,00(10,00-34,00)	0,160
Delay do diagnóstico (em anos), MDN (IQR) <sup>a</sup>	7,00(0,00-18,50)	8,50(0,00-15,50)	0,858
Índice de massa corporal, média ± DP <sup>b</sup>	28,15 ± 5,77	31,79 ± 6,10	0,043*
Escore HDRS, média ± DP <sup>b</sup>	4,64 ± 1,17	8,97 ± 1,19	> 0,001*
Escore YMRS, média ± DP <sup>b</sup>	1,50 ± 2,93	0,88 ± 1,41	0,418
Tabagismo atual, n (%) <sup>c</sup>	8(23,5)	10(58,8)	0,028
<i>Medicações em uso</i>			
Lítio, n (%) <sup>c</sup>	16(47,1)	8(38,2)	0,584
Anticonvulsantes, n (%) <sup>c</sup>	16(47,1)	9(42,9)	0,788
Antipsicóticos, n (%) <sup>c</sup>	15(44,1)	11(52,4)	0,589
Antidepressivos, n (%) <sup>c</sup>	7(20,6)	6(28,6)	0,529
Benzodiazepínicos, n (%) <sup>c</sup>	15(44,1)	6(28,6)	0,272
Anticolinérgico, n (%) <sup>c</sup>	1(2,9)	0(0,0)	1,000
<i>Comorbidades</i>			
Diabetes Mellitus, n (%) <sup>c</sup>	1(2,9)	2(11,8)	0,255
Hipotireoidismo, n (%) <sup>c</sup>	4(11,8)	1(5,9)	0,654
Hipertireoidismo, n (%) <sup>c</sup>	0(0,0)	1(5,9)	0,333
Hipertensão arterial sistêmica, n (%) <sup>c</sup>	7(20,6)	3(17,6)	1,000
Asma, n (%) <sup>c</sup>	3(8,8)	1(5,9)	1,000

**Tabela 1:** HDRS = Hamilton Depression Rating Scale. YMRS = Young Mania Rating Scale. MDN = mediana; IQR = intervalo interquartil; DP = desvio padrão. <sup>a</sup>Mann-Whitney, os dados estão expressos em mediana e intervalo interquartil (25 e 75 percentil). <sup>b</sup>Teste t de Student para amostras independentes, os dados estão expressos em média ± desvio padrão. <sup>c</sup>Teste exato de Fisher, os dados estão expressos em % de pacientes. \*Diferença entre pacientes bipolares depressivos *versus* eutímicos, p < 0.05 considerada significativa.

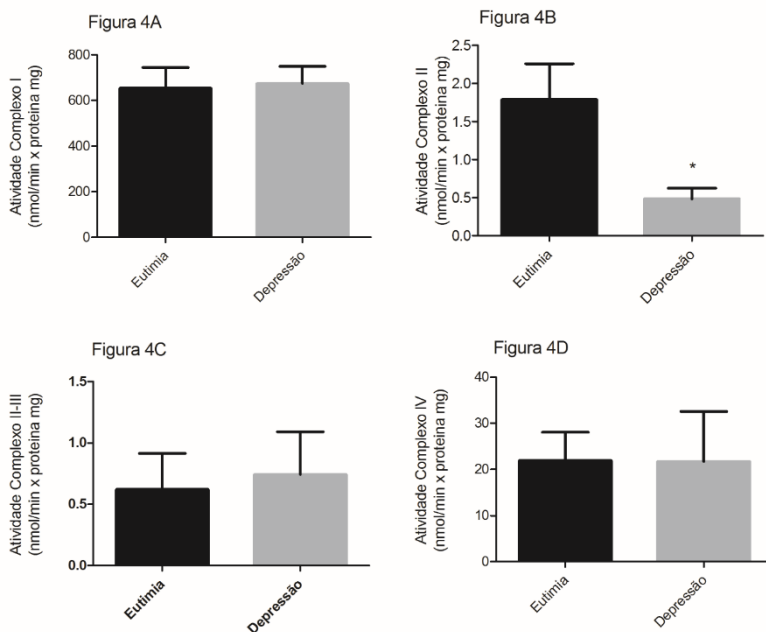
**Tabela 2 – Parâmetros bioquímicos**

Análises Bioquímicas	Pacientes bipolares		
	Eutímicos (n =17 )	Depressivos (n = 34)	Valor de p
<i>Complexos da cadeia respiratória</i>			
<i>mitocondrial</i>			
Complexo I, média ± DP	653,92±90,69	673,62±75,80	0,319
Complexo II, média ± DP	1,79±0,47	0,48±0,14	< 0,001*
Complexo II-III, média ± DP	0,62±0,29	0,74±0,35	0,230
Complexo IV, média ± DP	21,87±6,17	21,71±10,86	0,955
<i>Estresse Oxidativo</i>			
Superoxido, média ± DP	0,007±0,0015	0,045±0,014	< 0,001*
Superoxido dismutase, média ± DP	1,002±0,067	4,562±1,528	< 0,001*
TBARS, média ± DP	0,00099±0,0006	0,0039±0,002	< 0,001*
Carbonilação de proteína, média ± DP	2,201±0,889	6,563±1,605	< 0,001*
<i>Nitração de proteína</i>			
3-nitrotirosina, média ± DP	87,94±4,39	82,62±11,45	0,071

**Tabela 2:** Atividade dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial em células mononucleares de sangue periférico; Parâmetros de estresse oxidativo em partículas submitocondriais das células mononucleares do sangue periférico; 3-Nitrotirosina em partículas submitocondriais das células mononucleares do sangue periférico. Os resultados são expressos como média±DP. \*Diferença entre pacientes bipolares em episódio depressivo *versus* eutímicos p <0,05 foram consideradas estatisticamente significativas a partir do Teste *T Student*.

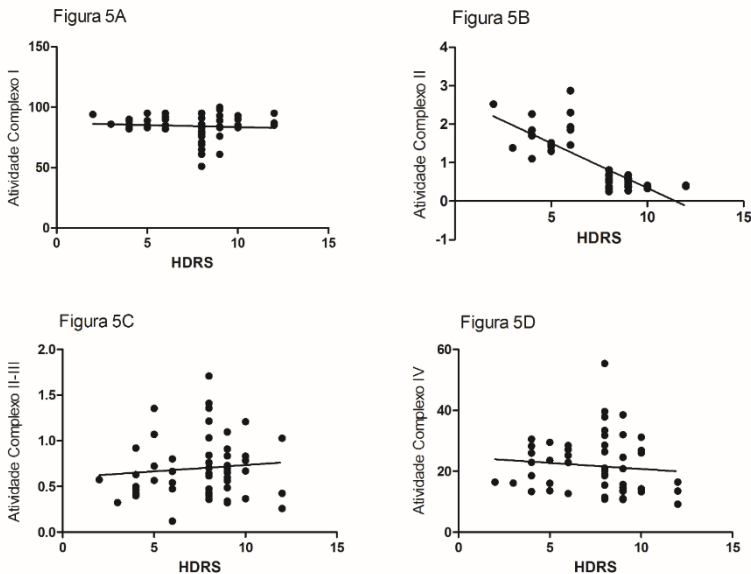
*Avaliação da atividade dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial (complexos I, II, II-III e IV) em linfócitos de pacientes com transtorno bipolar, durante episódio de depressão ou eutímia*

Os resultados da atividade dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial estão na figura 4 e na tabela 2. A atividade dos complexos I (Fig. 4A), II-III (Fig. 4C) e IV (Fig. 4D) não tiveram alterações ao comparar pacientes eutímicos e deprimidos. Por outro lado, a atividade do complexo II diminuiu nos pacientes em episódio depressivo (t=15,06, df=49, p<0,001), quando comparados com pacientes eutímicos (Fig. 4B).



**Figura 4:** Atividade dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial em células mononucleares de sangue periférico. Complexos I (A), II (B), II-III (C) e IV (D). Os resultados são expressos como média $\pm$ DP. \*Diferença entre pacientes bipolares em episódio depressivo vs eutímicos  $P < 0,05$  foram consideradas estatisticamente significativas a partir do Teste *T Student*.

Foi analisada a correlação entre o escore da HDRS e a atividade do complexo I (Fig. 5A), complexo II (Fig. 5B), complexo II-III (Fig. 5C) e complexo IV (Fig. 5D). A HDRS teve correlação negativa com o complexo II em células mononucleares de sangue periférico de pacientes bipolares ( $n=51$ ;  $r^2=0,65$ ;  $p<0,001$ ). A HDRS não mostrou correlação com a atividade do complexo I ( $n=51$ ;  $r^2=0,0061$ ;  $p=0,58$ ), II-III ( $n=51$ ;  $r^2=0,0095$ ;  $p=0,49$ ), ou IV ( $n=51$ ;  $r^2=0,0098$ ;  $p=0,49$ ).

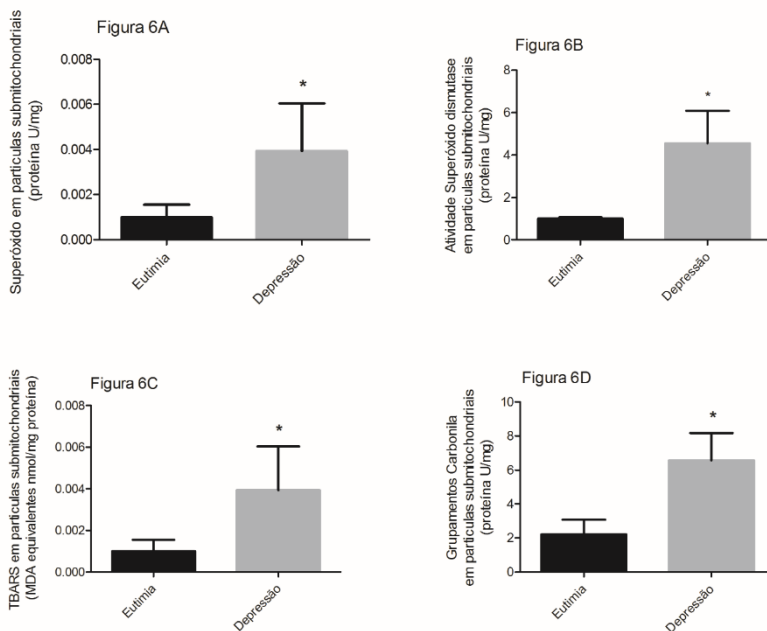


**Figura 5:** Correlações entre HDRS e complexos I (A), II (B), II-III (C) e IV (D) em células mononucleares de sangue periférico de pacientes bipolares. Os resultados foram avaliados utilizando o teste de correlação de Pearson.

*Avaliação de parâmetros de estresse oxidativo em partículas submitocondriais em linfócitos de pacientes com transtorno bipolar, durante episódio de depressão ou eutímia*

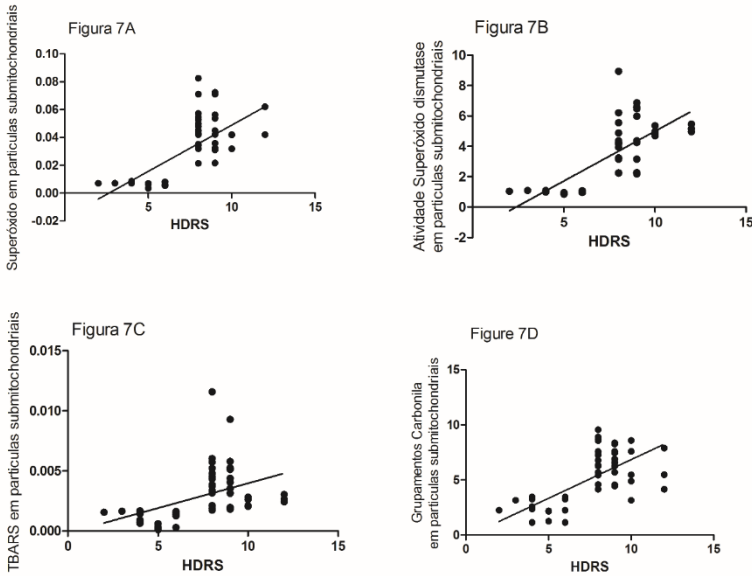
A figure 6 e tabela 2 demonstram os resultados dos parâmetros de estresse oxidativo em partículas submitocondriais das células mononucleares do sangue periférico. Os pacientes bipolares deprimidos tiveram um aumento significativo nos níveis de ânion radical superóxido nas partículas submitocondriais ( $t = 10,92$ ,  $df = 49$ ,  $p < 0,001$ ) em comparação com o eutímico (Fig. 6A). Além disso, os pacientes em episódio depressivo apresentaram atividade da SOD ( $t=9,55$ ,  $df=49$ ,  $p<0,001$ ) (Fig. 6B). Os danos lipídicos e proteicos foram medidos por TBARS ( $t=5,65$ ,  $df=49$ ,  $p<0,001$ ) (Fig. 6C) e carbonilação de proteína ( $t=10,4$ ,  $df=49$ ,  $p<0,001$ ) (Fig. 6D) consecutivamente em partículas submitocondriais. Estes resultados demonstram um aumento dos danos nos lipídeos e proteínas nos pacientes bipolares deprimidos em comparação com os pacientes bipolares eutímicos.





**Figura 6:** Parâmetros de estresse oxidativo em partículas submitocondriais das células mononucleares do sangue periférico. Níveis de superóxido (A), atividade da superóxido dismutase (B), dano a lipídeos TBARS (C) e carbonilação de proteínas (D). Os resultados são expressos como média±DP. \*Diferença entre pacientes bipolares em episódio depressivo vs eutímicos  $p < 0,05$  foram consideradas estatisticamente significativas a partir do Teste *T Student*.

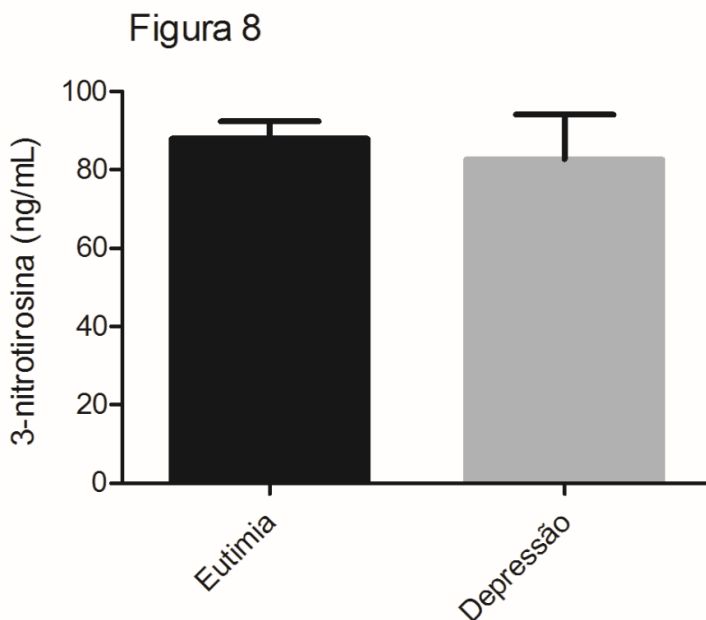
O estudo também analisou a correlação entre a pontuação HDRS e ânion radical superóxido (Fig. 7A), atividade da SOD (Fig. 7B), níveis de TBARS (Fig. 7C) e níveis de grupamentos carbonila (Fig. 7D). HDRS teve correlação positiva com os níveis de ânion radical superóxido ( $n=51$ ;  $r^2=0,53$ ;  $p<0,001$ ), atividade da SOD ( $n=51$ ;  $r^2=0,55$ ;  $p<0,001$ ), níveis de TBARS ( $n=51$ ;  $r^2=0,19$ ;  $p=0,0013$ ) e níveis de grupamentos carbonila ( $n=51$ ;  $r^2=0,44$ ;  $p<0,001$ ).



**Figura 7:** Correlação entre níveis de HDRS e superóxido (A), atividade de superóxido dismutase (B), níveis de TBARS (C) e níveis de carbonilação de proteínas (D) em partículas submucoronárias de células mononucleares de sangue periférico de pacientes bipolares. Os resultados foram avaliados utilizando o teste de correlação de Pearson.

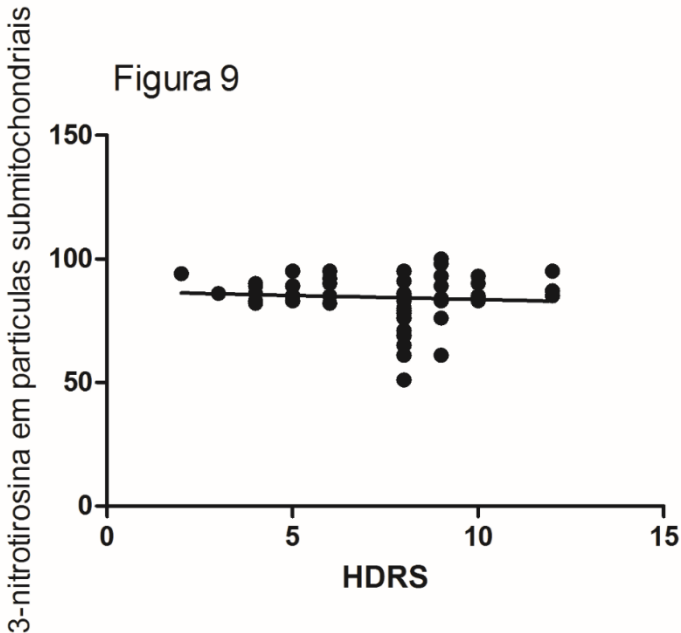
*Avaliação a nitração de proteínas através de quantificação de 3-nitrotirosina em partículas submitocondriais em linfócitos de pacientes com transtorno bipolar, durante episódio de depressão ou eutímia.*

A Figura 8 e a Tabela 2 mostram os resultados dos níveis de 3-nitrotirosina, um produto de nitração de proteína tirosina. Os resultados não mostraram diferença significativa entre os grupos de pacientes estudados. Além disso, foi analisada a correlação entre o escore HDRS e os níveis de 3-nitrotirosina (Fig. 8). HDRS não mostrou nenhuma correlação com a 3-nitrotirosina ( $n=51$ ;  $r^2=0,006$ ;  $p=0,58$ ).



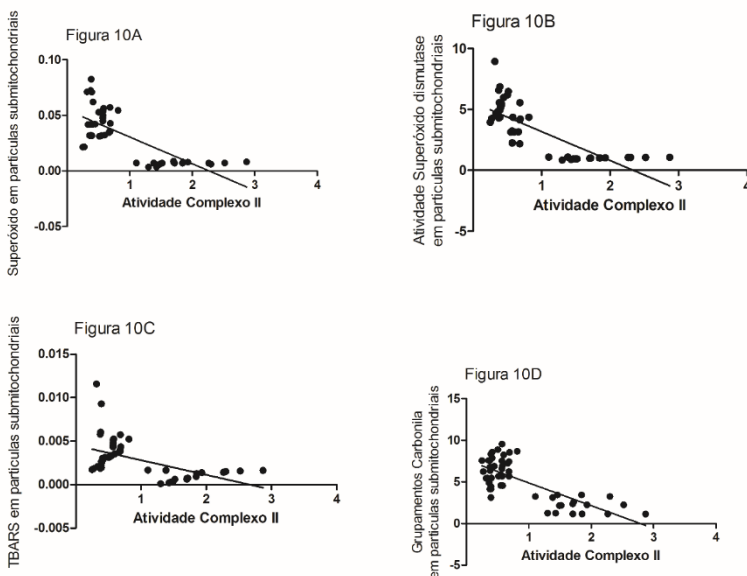
**Figura 8:** 3-Nitrotirosina em partículas submitocondriais das células mononucleares do sangue periférico. Os resultados são expressos como média±DP. \*Diferença entre pacientes bipolares em episódio depressivo vs eutímicos  $p < 0,05$  foram consideradas estatisticamente significativas a partir do Teste T Student.

Além disso, analisou-se a correlação entre a pontuação da HDRS score e os níveis de 3-nitrotirosina (Fig. 9). HDRS não mostrou nenhuma correlação com 3-nitrotirosina ( $n=51$ ;  $r^2=0,006$ ;  $p=0,58$ ).



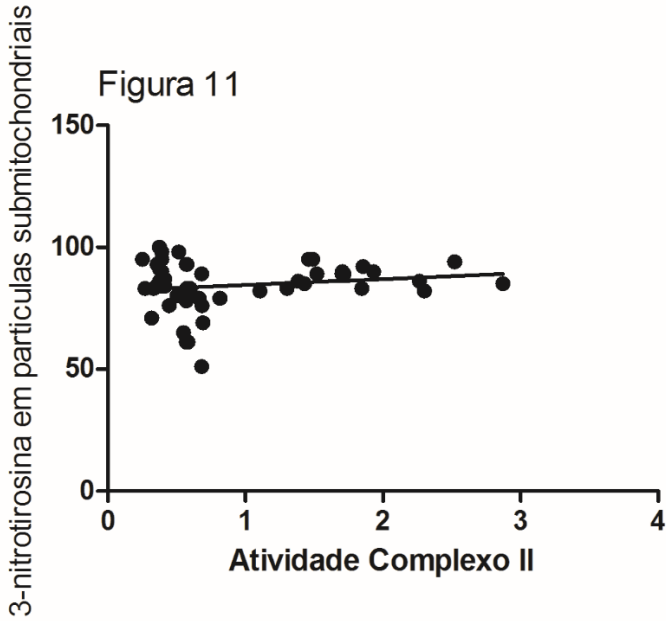
**Figura 9:** Correlação entre HDRS e 3-nitrotirosina em partículas submitocondriais das células mononucleares do sangue periférico de pacientes bipolares. Os resultados foram avaliados utilizando o teste de correlação de Pearson.

Analisou-se também a correlação entre a atividade do complexo II e os níveis do ânion radical superóxido (Fig. 10A), a atividade da SOD (Fig. 10B), os níveis de TBARS (Fig. 10C) e os níveis de carbonilação de proteínas (Fig. 10D). A atividade do complexo II foi negativamente correlacionada com os níveis do ânion radical superóxido ( $n=51$ ;  $r^2=0,57$ ;  $p<0,001$ ), a atividade da SOD ( $n=51$ ;  $r^2=0,598$ ;  $p<0,001$ ), os níveis de TBARS ( $n=51$ ;  $r^2=0,19$ ;  $p<0,001$ ) e os níveis de carbonilação de proteínas ( $n=51$ ;  $r^2=0,56$ ;  $p<0,001$ ).



**Figura 10:** Correlações entre a atividade do complexo II e níveis de superóxido (A), superóxido dismutase (B), níveis de TBARS (C) e níveis de carbonilação de proteínas (D) em partículas submitocondriais das células mononucleares do sangue periférico de pacientes bipolares. Os resultados foram avaliados utilizando o teste de correlação de Pearson.

Também foi analisada a correlação entre a atividade do complexo II e os níveis de 3-nitrotirosina (Fig. 11). A atividade do complexo II não mostrou nenhuma correlação com os níveis de 3-nitrotirosina ( $n=51$ ;  $r^2=0,03$ ;  $p=0,25$ ).



**Figura 11:** Correlações entre a atividade do complexo II e a 3-nitrotirosina em partículas submitocondriais de células mononucleares de sangue periférico de pacientes bipolares. Os resultados foram avaliados utilizando o teste de correlação de Pearson.

## 5 DISCUSSÃO

Vários estudos, tanto clínicos quanto pré-clínicos, demonstraram que alterações mitocondriais desempenham um papel importante na fisiopatologia do TB (Halliwell, 2006; Andreazza et al., 2009; Berk et al., 2011). No presente estudo, demonstrou-se que há também diferenças nos mecanismos mitocondriais entre os episódios de eutímia e de depressão bipolar. No entanto, os mecanismos específicos subjacentes a estas disfunções ainda permanecem desconhecidos. Andreazza et al. (2010) demonstraram que os pacientes com TB possuem níveis mais elevados de oxidação de proteína mitocondrial do que controles saudáveis. Além disso, Chang e colaboradores (2014) encontraram menores números de cópias de ácido desoxirribonucleico mitocondrial (mtDNA) e níveis mais baixos de dano oxidativo ao mtDNA em leucócitos de pacientes com TB. Estas alterações podem levar a certas disfunções mitocondriais, incluindo o comprometimento dos complexos da cadeia respiratória (Scola et al., 2013; Akarsu et al., 2015), com consequente prejuízo na formação de ATP (Dudley et al., 2016) e aumento dos níveis de ERO (Steckert et al., 2013; Scola et al., 2016). É importante ressaltar que a disfunção mitocondrial, com consequente prejuízo no metabolismo energético celular, tem sido descrita como principal desencadeador de estresse oxidativo (Kato, 2007).

Os resultados do presente estudo demonstraram uma diminuição acentuada na atividade do complexo II em células mononucleares de sangue periférico de pacientes bipolares deprimidos, quando comparados com pacientes eutímicos. Além disso, foi demonstrado que a HDRS estava negativamente correlacionada com o complexo II em células mononucleares de sangue periférico de pacientes bipolares, demonstrando uma relação significativa entre estas variáveis. O TB tem sido associado a vários tipos de danos mitocondriais, tanto no cérebro como no sangue dos pacientes (de Sousa et al., 2014). Recentemente, Akarsu e colaboradores (2015), avaliaram amostras de sangue periférico, onde foi demonstrado uma diferença significativa na expressão dos genes de subunidades do complexo I entre o grupo TB e o grupo de controle saudável para os seguintes genes: NDUFV1, NDUFV2 e NDUFS1. Neste mesmo estudo, observou-se que os níveis de NDUFS7 e atividade do complexo I foram significativamente menores no córtex pré-frontal de pacientes com TB do que de indivíduos saudáveis (Akarsu et al., 2015). Em outro estudo, não foi encontrada diferença significativa na atividade do complexo I em células mononucleares do sangue periférico de pacientes eutímicos comparados com controles saudáveis (Gubert et al.,

2013). de Souza e colegas (2015) também não encontraram diferenças significativas nas atividades dos complexos mitocondriais I-IV em células mononucleares durante o episódio depressivo bipolar, quando comparados com controles saudáveis (de Sousa et al., 2015). Essas diferenças podem ser explicadas pelo fato de que o presente estudo comparou os pacientes bipolares em episódio depressivo com os que estavam em eutímia, enquanto os estudos anteriores compararam pacientes bipolares eutímicos com controles saudáveis. O presente estudo é o primeiro a mostrar uma diferença na atividade do complexo II entre pacientes bipolares em eutímia *versus* depressão.

Yuksel e colegas (2015), utilizando a espectroscopia de ressonância magnética demonstraram que, quando comparados com controles saudáveis, os pacientes com TB têm níveis mais baixos de ATP no lobo occipital. Outro estudo utilizou a mesma técnica para demonstrar que os níveis de PCr e ATP no cérebro de sujeitos com TB, encontrando uma correlação negativa entre os parâmetros avaliados e a idade dos pacientes. Notavelmente, esse estudo também mostrou que os níveis de PCr estavam positivamente correlacionados com a idade dos controles saudáveis (Dudley et al., 2015). Juntamente com nossos dados, esses estudos sugerem que a deficiência bioenergética relacionada à disfunção mitocondrial pode desempenhar um papel importante na fisiopatologia do TB. Além disso, o estado energético celular anormal pode causar danos na função neural e plasticidade sináptica e, conseqüentemente, levar a danos cognitivos e alterações de humor, ambos observados no TB.

No presente trabalho, a diminuição da atividade do complexo II foi acompanhada por estresse oxidativo em partículas submitocondriais de células mononucleares de pacientes bipolares deprimidos. É bem descrito na literatura que a superprodução de ERO pode ser causa ou consequência de danos mitocondriais. A produção mitocondrial do ânion radical superóxido ocorre principalmente nos complexos I e III (Orrenius et al., 2007; Koopman et al., 2010; Selivanov et al., 2011), podendo ser consequência da transição de um elétron da NADH e da FADH para a ubiquinona. A geração de ERO ocorre quando a molécula de oxigênio é reduzida por somente um elétron ao invés de quatro, o qual levaria a formação de duas moléculas de água e, conseqüentemente, a neutralização da molécula. Os radicais livres podem atuar diretamente nos complexos da cadeia respiratória mitocondrial. A exposição crônica a ERO pode resultar em dano oxidativo as proteínas, aos lipídeos e aos ácidos nucleicos, com conseqüente baixa na produção de ATP, disfunção celular ou, até mesmo, a morte celular (Ghezzi e Zeviani, 2012). Nossos



resultados demonstram uma correlação negativa na atividade do complexo II em relação aos níveis da enzima antioxidante SOD, do ânion radical superóxido, dos níveis de TBARS e de grupamentos carbonila. No presente estudo, os altos níveis de superóxido mitocondrial, o dano oxidativo aos lipídeos e as proteínas mitocondriais nos pacientes depressivos podem ser explicados, pelo menos em parte, pela inibição do complexo II. Está bem descrito na literatura que a atividade reduzida dos complexos da cadeia de transporte de elétrons e a produção aumentada de ERO com redução na capacidade do tamponamento de  $\text{Ca}^{2+}$  pode levar a morte celular (Callaly et al., 2015; Mattson, 2007; Soeiro-de-Souza et al., 2014; Steckert et al., 2010).

No presente estudo foi observado dano aos lipídeos e as proteínas encontradas nos pacientes bipolares em depressão, quando comparados com os pacientes eutímicos. Siwek e colegas (2016) também demonstraram que os níveis de TBARS foram significativamente mais altos durante os episódios agudos de mania/hipomania ou depressão, mas não na eutímia, quando comparados com controles saudáveis. Em um estudo prévio foi demonstrado níveis de TBARS sérico elevados em pacientes bipolares em fase maníaca, quando comparado com indivíduos saudáveis. Além disso, nesse mesmo estudo, a atividade da GPx dos pacientes bipolares foi significativamente menor do que a dos indivíduos saudáveis (Tsai e Huang, 2015). Kunz e colegas (2008) também demonstraram níveis de TBARS maiores em pacientes bipolares que estavam em eutímia, em mania e em depressão quando comparados com controles saudáveis. Um estudo prévio também demonstrou níveis de dano oxidativo aos lipídeos maiores em pacientes bipolares do que em indivíduos saudáveis (Andreazza et al., 2015).

Dano oxidativo às proteínas têm sido descritas tanto no TB quanto na depressão maior, sendo que níveis elevados de carbonilação de proteína no conteúdo sérico foram encontrados (Magalhães et al., 2012). Um estudo anterior demonstrou aumento significativo nos níveis de 3-nitrotirosina no sangue de pacientes com TB nas fases precoces e tardias deste transtorno (Andreazza et al., 2009). Andreazza e colegas (2013) encontraram um aumento na carbonilação de proteínas em sinaptossomas de córtex pré-frontal de bipolares. Nesse mesmo estudo, os níveis de 3-nitrotirosina estavam aumentados em mitocôndrias do córtex pré-frontal de pacientes com TB. Corroborando com esses resultados, um estudo anterior também mostrou níveis aumentados de 3-nitrotirosina mitocondrial no córtex pré-frontal de pacientes bipolares (Andreazza et al., 2009). No presente estudo, não foram observadas alterações nos níveis mitocondriais de 3-nitrotirosina em células mononucleares do sangue

periférico dos pacientes bipolares depressivos, quando comparado com os eutímicos. Um estudo anterior não encontrou diferença significativa nos níveis de 3-nitrotirosina em plasma de pacientes eutímicos idosos com TB I ou II e indivíduos saudáveis mais velhos (Andreazza et al., 2015). Embora o presente estudo compare depressão bipolar *vs* eutímia e o estudo de Andreazza compare pacientes com TB tipo I ou II *vs* controles saudáveis, ambos sugerem que o dano nitrosativo não tem envolvimento na fisiopatologia do TB.

No presente estudo um aumento nos níveis da atividade da SOD em partículas submitocondriais de linfócitos de pacientes depressivos bipolares foi encontrado. Uma correlação positiva entre HDRS e SOD também foi encontrado. Além disso, houve correlação negativa entre atividade de complexo II e atividade de SOD, demonstrando uma importante relação entre essas variáveis. A atividade antioxidante alterada tem sido demonstrada em pacientes bipolares. Em um estudo prévio, de Sousa e colegas (2014) mostraram que pacientes em episódio atual de depressão bipolar apresentam aumento significativo em níveis de CAT e GPx, juntamente com uma menor relação SOD/CAT no soro, quando comparada com controles saudáveis. Consistente com os nossos resultados, outro estudo constatou que a atividade SOD sérica foi significativamente aumentada em pacientes bipolares maníacos e deprimidos (Kunz et al., 2008). A SOD é bem descrita como uma enzima antioxidante de defesa primária, capaz de reduzir o radical superóxido em peróxido de hidrogênio, para assim ser convertido em água e oxigênio molecular por CAT ou GPx. Quando uma célula tem níveis aumentados de SOD sem um aumento proporcional de peroxidases, o excesso de ânion radical superóxido produzido pode causar danos oxidativos às células e aos complexos mitocondriais (Halliwell e Gutteridge, 1997; Ghezzi e Zeviani, 2012). Além disso, o ânion radical superóxido pode reagir com metais de transição e gerar o ânion radical hidroxila, que é o radical mais nocivo (Halliwell e Gutteridge, 1997). Consequentemente, a superexpressão da SOD mitocondrial, observada no presente estudo, representa uma alteração nos mecanismos antioxidantes, que pode levar a efeitos deletérios nos complexos mitocondriais.

É importante ressaltar que no presente estudo não foram excluídos pacientes com doença física, como diabetes mellitus, hipotireoidismo, hipertireoidismo, hipertensão arterial sistêmica e asma. Essas doenças também podem afetar a função mitocondrial e gerar estresse oxidativo. Dado que as comorbidades são um grande problema no TB (Lin et al., 2014; Hajek et al., 2016; Vancampfort et al., 2016; Jesus et al., 2016), é

realmente difícil conseguir uma boa amostra para estudo excluindo todas as comorbidades (físicas e mentais). Entretanto, no presente estudo, foi realizado o cuidado de verificar a porcentagem de pacientes com estas doenças físicas e comparar pacientes eufímicos vs depressivos, e não foram encontradas diferenças estatísticas.

Entre as características dos pacientes mostardas na Tabela 1 pode ser observada uma diferença significativa no IMC dos pacientes bipolares depressivos quando comparado aos pacientes eufímicos. Tendo como base a Tabela 3, que identifica os níveis de IMC para adultos de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS); os pacientes em eutímia apresentam uma média geral de 28,15 sendo classificada como sobrepeso e os pacientes em depressão bipolar apresentaram uma média geral de 31,79 classificada como obesidade I. A obesidade pode ser uma importante limitação do presente estudo já que a obesidade por si só apresenta alterações metabólicas e aumento de estresse oxidativo (Gomes et al., 2010; França et al., 2013). Outro ponto importante na discussão sobre aumento de IMC dos pacientes bipolares do presente estudo é a farmacoterapia, que pode trazer vários efeitos colaterais, entre eles o aumento de apetite e o ganho de peso do paciente. O ganho de peso é uma causa frequente para falta de adesão ao medicamento, levando por vezes a interrupção do tratamento pelo paciente, e, conseqüente, a piora do prognóstico do transtorno (Abeso, 2009; Almeida et al., 2009).

**Tabela 3 Classificação IMC de adultos segundo a OMS**

IMC (kg/m <sup>2</sup> )	CLASSIFICAÇÕES
Menor que 18,5	Baixo peso
18,5 – 24,9	Peso normal
25,0 – 29,9	Sobrepeso
30,0 – 34,9	Obesidade I
35,0 – 39,9	Obesidade II
Maior ou igual a 40,0	Obesidade III

**Tabela 3:** Adaptada das Diretrizes brasileiras de obesidade 2009/2010 (Abeso, 2009).

Outro ponto importante a considerar é que a farmacoterapia também pode interferir na função mitocondrial e no estresse oxidativo. No entanto, um estudo livre de fármaco ou *drug-naive* é bastante complexo com os pacientes com TB e não é praticável pelo presente grupo de pesquisa. Na verdade, por causa desta dificuldade, o medicamento tem sido sempre uma limitação em estudos com pacientes bipolares. É importante ressaltar que foi analisado o percentual de pacientes que estavam em tratamento com lítio, anticonvulsivantes, antipsicóticos, antidepressivos,

benzodiazepínicos e anticolinérgicos. Ao comparar pacientes eufímicos vs depressivos não foram observadas diferenças significativas em relação a farmacoterapia. Além disso, o impacto de diferentes tipos de medicações nos parâmetros bioquímicos não pôde ser examinado porque todos os pacientes estão em tratamento com polifarmácia.

As principais limitações deste estudo foram a falta de pacientes maníacos e um grupo controle saudável. Além disso, os pacientes no grupo deprimido não parecem ter sido severamente deprimidos (média HDRS 8,94), que é apenas ligeiramente aumentada em comparação com os resultados dos pacientes eufímicos (média HDRS 4,65). É importante mencionar que os resultados apresentados aqui se referem ao sistema periférico e podem não ser uma representação exata do que está acontecendo no sistema nervoso central.

## 6. CONCLUSÃO

Em conclusão, o presente estudo mostrou uma diminuição acentuada na atividade no complexo II da cadeia respiratória mitocondrial em células mononucleares de sangue de pacientes depressivos bipolares em comparação com pacientes bipolares eutímicos. Além disso, a diminuição da atividade do complexo II foi acompanhada por danos oxidativos aos lipídeos e as proteínas, atividade aumentada de SOD e aumento da produção do ânion radical superóxido em partículas submitocondriais de células mononucleares do sangue periférico de pacientes depressivos bipolares. Os dados deste estudo sugerem que o estresse oxidativo mitocondrial e disfunção no complexo II desempenham papéis importantes na fase depressiva do TB.

**REFERÊNCIAS**

- Adams JM, Cory S. Bcl-2-regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential. *Curr Opin Immunol*. 2007;19(5):488-96.
- Adam-Vizi V, Chinopoulos C. Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species. *Trends Pharmacol Sci*. 2006;27(12):639-45.
- Alberich S, Martínez-Cengotitabengoa M, López P, Zorrilla I, Núñez N, Vieta E, González-Pinto A. Efficacy and safety of ketamine in bipolar depression: A systematic review. *Rev Psiquiatr Salud Ment*. 2016. pii: S1888-9891(16)30025-8.
- American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders. 5<sup>a</sup> ed. Washington, DC; 2013.
- Andreazza AC, Kapczinski F, Kauer-Sant'anna M, Walz JC, Bond DJ, Gonçalves CA, Young LT, Yatham LN. 3-Nitrotyrosine and glutathione antioxidant system in patients in the early and late stages of bipolar disorder. *J Psychiatry Neurosci*. 2009;34(4):263-71.
- Andreazza AC, Shao L, Wang JF, Young LT. Mitochondrial complex I activity and oxidative damage to mitochondrial proteins in the prefrontal cortex of patients with bipolar disorder. *Arch Gen Psychiatry*. 2010;67(4):360-8.
- Andreazza AC, Wang JF, Salmasi F, Shao L, Young LT. Specific subcellular changes in oxidative stress in prefrontal cortex from patients with bipolar disorder. *J Neurochem*. 2013;127(4):552-61.
- Bannister JV, Calabrese L. Assays for superoxide dismutase. *Methods Biochem Anal*. 1987;32:279-312.
- Barbosa GI, Teixeira AL. Depressão bipolar. In: Kapczinski, F; Quevedo, J. editores. *Transtorno Bipolar. Teoria e clínica*. 2<sup>a</sup> ed. Porto Alegre: Artmed; 2016. p. 320.
- Barbosa KBF, Costa NMB, Alfenas RCG, Paula SO, Minim VPR, Bressan J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Rev Nutr*. 2010;23(4):629-43.
- Beal MF. Oxidatively modified proteins in aging and disease. *Free Radic Biol Med*. 2002;32(9):797-803.
- Bega S, Schaffer A, Goldstein B, Levitt A. Differentiating between Bipolar Disorder types I and II: results from the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions (NESARC). *J Affect Disord*. 2012;138(1-2):46-53.

- Beigel A, Murphy DL, Bunney WEJ. The manic-state rating scale: scale construction, reliability, and validity. *Arch Gen Psychiatry*. 1971;25:256–262.
- 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.
- Bielau H, Steiner J, Mawrin C, Trübner K, Brisch R, Meyer-Lotz G, Brodhun M, Dobrowolny H, Baumann B, Gos T, Bernstein HG, Bogerts B. Dysregulation of GABAergic neurotransmission in mood disorders: a postmortem study. *Ann N Y Acad Sci*. 2007;1096:157-69.
- Boveris A, Oshino N, Chance B. The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem J*. 1972;128(3):617-30.
- Boveris A. Determination of the production of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria. *Methods Enzymol*. 1984;105:429-35.
- Bowler RP, Crapo JD. Oxidative stress in airways: is there a role for extracellular superoxide dismutase? *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;166(12):38-43.
- Boyum A. Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. *Scand. J. Immunol*. 1976; Suppl 5:9-15.
- Cassina A, Radi R. Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. *Arch Biochem Biophys*. 1996;328(2):309-316.
- Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev*. 1979;59(3):527-605.
- Clay HB, Sullivan S, Konradi C. Mitochondrial dysfunction and pathology in bipolar disorder and schizophrenia. *Int J Dev Neurosci*. 2011;9(3):311-24.
- Clemente AS, Diniz BS, Nicolato R, Kapczinski FP, Soares JC, Firmo JO, Castro-Costa É. Bipolar disorder prevalence: a systematic review and meta-analysis of the literature. *Rev Bras Psiquiatr*. 2015;37(2):155-61.
- Costa AMN. Transtorno afetivo bipolar: carga da doença e custos relacionados. *Rev Psiquiátr Clin*. 2008;35(3):104-10
- Cuellar AK, Johnson SL, Winters R. Distinctions between bipolar and unipolar depression. *Clin Psychol Rev*. 2005;25(3):307-39.
- Davies KJ. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochem Soc Symp* 1995;61:1–31.
- Del-Ben CM, Vilela JAA, Crippa JAS, Hallak JEC, Labate CM, Zuardi AW. Reliability of the Structured Clinical Interview for DSM-IV –

Clinical Version translated into Portuguese. *Rev Bras Psiquiatr.* 2001; 23(3):156-9.

Drevets WC. Neuroimaging and neuropathological studies of depression: implications for the cognitive-emotional features of mood disorders. *Curr Opin Immunol.* 2001;11(2): 240-249.

Dudley JA, Lee JH, Durling M, Strakowski SM, Eliassen JC. Age-dependent decreases of high energy phosphates in cerebral gray matter of patients with bipolar I disorder: a preliminary phosphorus-31 magnetic resonance spectroscopic imaging study. *J Affect Disord.* 2015;175:251-5.

Einat H, Yuan P, Gould TD, Li J, Du J, Zhang L, Manji HK, Chen G. The role of the extracellular signal-regulated kinase signaling pathway in mood modulation. *J Neurosci.* 2003;23(19):7311-6.

Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol.* 1990;186:407-21.

Fischer JC, Ruitenbeek W, Berden JA, Trijbels JM, Veerkamp JH, Stadhouders AM, Sengers RC, Janssen AJ. Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. *Clin Chim Acta.* 1985;153(1):23-36.

Fries GR, Pfaffenseller B, Kapczinski F. Fisiopatologia do transtorno bipolar: novas tendências. In: Kapczinski F, Quevedo J. Organizadores. editores. *Transtorno Bipolar: Teoria e clínica.* 2ª ed. Porto Alegre: Artmed; 2016. p. 320.

Gama CS, Goldani AAS, Fijtman A, Rosa AR. Tratamento farmacológico do transtorno bipolar. In: Kapczinski F, Quevedo J. editores. *Transtorno Bipolar: Teoria e clínica.* 2ª ed. Porto Alegre: Artmed; 2016. p. 320.

Geddes JR, Miklowitz DJ. Treatment of bipolar disorder. *Lancet.* 2013;381(9878):1672-82.

Ghaemi SN, Lenox MS, Baldessarini RJ. Effectiveness and safety of long-term antidepressant treatment in bipolar disorder. *J Clin Psychiatry.* 2001;62(7):565-9.

Ghaemi SN, Lenox MS, Baldessarini RJ. Effectiveness and safety of long-term antidepressant treatment in bipolar disorder. *J Clin Psychiatry.* 2001;62(7):565-9.

Gigante AD, Andreatza AC, Lafer B, Yatham LN, Beasley CL, Young LT. Decreased mRNA expression of uncoupling protein 2, a mitochondrial próton transporter in post-mortem pre frontal córtex from patients with bipolar disorder and schizophrenia. *Neurosci Lett.* 2011;505(1):47-51.



- Gubert C, Stertz L, Pfaffenseller B, Panizzutti BS, Rezin GT, Massuda R, Streck EL, Gama CS, Kapczinski F, Kunz M. Mitochondrial activity and oxidative stress markers in peripheral blood mononuclear cells of patients with bipolar disorder, schizophrenia, and healthy subjects. *J Psychiatr Res.* 2013;47(10):1396-402.
- Haber F, Weiss JJ. The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proc Royal Soc London.* 1934;147(1):332-51.
- Haddad PM, Das A, Ashfaq M, Wieck A. A review of valproate in psychiatric practice. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2009;5(5):539-51.
- Halliwell B, Gutteridge J. *Free Radicals in Biology and Medicine.* 1<sup>a</sup> ed. Nova York: Oxford; 1989.
- Halliwell B, Gutteridge JM. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.* 1990;186(1):1-85.
- Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans.* 2007;35(Pt 5):1147-50.
- Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem.* 2006;97(6):1634-58.
- Han D, Antunes F, Canali R, Rettori D, Cadenas E. Voltage-dependent anion channels control the release of the superoxide anion from mitochondria to cytosol. *J Biol Chem.* 2003;278(8):5557-63.
- Heales SJ, Bolaños JP, Stewart VC, Brookes PS, Land JM, Clark JB. Nitric oxide, mitochondria and neurological disease. *Biochim Biophys Acta.* 1999;1410(2):215-28.
- Heales SJ, Bolaños JP, Stewart VC, Brookes PS, Land JM. *Manic-Depressive Illness.* Oxford University Press, New York, 1990.
- Hyman S, Chisholm D, Kessler R, Patel V, Whiteford H. Mental disorders. In: Jamison DT, Breman JG, Measham AR, Alleyne G, Claeson M, Evans DB, Jha P, Mills A, Musgrove P. editores. *Source Disease Control Priorities in Developing Countries.* 2<sup>a</sup> ed. Washington: World Bank; 2006. p. 605-25.
- Irie Y, Saeki M, Kamisaki Y, Martin E, Murad F. Histone H1.2 is a substrate for denitrase, an activity that reduces nitrotyrosine immunoreactivity in proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(10):5634-9.
- Judd LL, Schettler PJ, Akiskal HS, Maser J, Coryell W, Solomon D, Endicott J, Keller M. Long-term symptomatic status of bipolar I vs. bipolar II disorders. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2003;6(2):127-37.
- Kapczinski F, Dal-Pizzol F, Teixeira AL, Magalhaes PV, Kauer-Sant'Anna M, Klamt F, Moreira JC, de Bittencourt Pasquali MA, Fries GR, Quevedo J, Gama CS, Post R. Peripheral biomarkers and illness activity in bipolar disorder. *J Psychiatr Res.* 2011;45(2):156-61.

- 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.
- Kato T, Kato N. Mitochondrial dysfunction in bipolar disorder. *Bipolar Disord.* 2000;2(3 Pt 1):180-190.
- Kharitonov SA, Barnes PJ. Nitric oxide, nitrotyrosine, and nitric oxide modulators in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2003; 3(2):121-9.
- Konradi C, Eaton M, MacDonald ML, Walsh J, Benes FM, Heckers S. Molecular evidence for mitochondrial dysfunction in bipolar disorder. *Arch Gen Psychiatry.* 2004;61(3): 300-308.
- Koopman WJ, Nijtmans LG, Dieteren CE, Roestenberg P, Valsecchi F, Smeitink JA, Willems PH. Mammalian mitochondrial complex I: biogenesis, regulation, and reactive oxygen species generation. *Antioxid Redox Signal.* 2010;12(12):1431-70.
- Kooy NW, Royall JA, Ischiropoulos H. Oxidation of 2',7'-dichlorofluorescein by peroxynitrite. *Free Radic Res.* 1997;27(3):245-54.
- Kunz M, Gama CS, Andreazza AC, Salvador M, Cereser KM, Gomes FA, Belmonte-de-Abreu PS, Berk M, Kapczinski F. Elevated serum superoxide dismutase and thiobarbituric acid reactive substances in different phases of bipolar disorder and in schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2008;32(7):1677-81.
- Kupka RW, Altshuler LL, Nolen WA, Suppes T, Luckenbaugh DA, Leverich GS, Frye MA, Keck PE Jr, McElroy SL, Grunze H, Post RM. Three times more days depressed than manic or hypomanic in both bipolar I and bipolar II disorder. *Bipolar Disord.* 2007;9(5):531-5.
- Lantos J, Temes G, Röth R, Morvay G. Alterations in malondialdehyde concentration of jugular vein blood following transient brain ischemia. The effect of lactic acidosis. *Acta Physiol Hung.* 1994;82(3):229-36.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193:265-75.
- Lund C, Tomlinson M, De Silva M, Fekadu A, Shidhaye R, Jordans M, Petersen I, Bhana A, Kigozi F, Prince M, Thornicroft G, Hanlon C, Kakuma R, McDaid D, Saxena S, Chisholm D, Raja S, Kippen-Wood S, Honikman S, Fairall L, Patel V. Prime: A programme to reduce the treatment gap for mental disorders in five low- and middle-income countries. *PLoS Med.* 2012;9(12):e1001359.
- Machado-Vieira R, Andreazza AC, Viale CI, Zanatto V, Cereser V Jr, da Silva Vargas R, Kapczinski F, Portela LV, Souza DO, Salvador M, Gentil

- V. Oxidative stress parameters in unmedicated and treated bipolar subjects during initial manic episode: a possible role for lithium antioxidant effects. *Neurosci Lett.* 2007;421(1):33-6.
- Magalhães PV, Jansen K, Pinheiro RT, Colpo GD, da Motta LL, Klamt F, da Silva RA, Kapczinski F. Peripheral oxidative damage in early-stage mood disorders: a nested population-based case-control study. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 2012;15(8):1043-50.
- Magalhães PVS, Costa MH, Pinheiro RT. Epidemiologia do transtorno bipolar. In: Kapczinski, F; Quevedo, J. editores. *Transtorno Bipolar. Teoria e clínica.* 2ª ed. Porto Alegre: Artmed; 2016. p. 320.
- Manji HK, Chen G. PKC, MAP kinases and the bcl-2 family of proteins as long-term targets for mood stabilizers. *Mol Psychiatry.* 2002;7 Suppl 1:S46-56.
- Manji HK, Duman RS. Impairments of neuroplasticity and cellular resilience in severe mood disorders: implications for the development of novel therapeutics. *Psychopharmacol Bull.* 2001;35(2):5-49.
- 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.
- Morris G, Berk M. The many roads to mitochondrial dysfunction in neuroimmune and neuropsychiatric disorders. *BMC Med.* 2015;13:68.
- Namjoshi MA, Buesching DP. A review of the health-related quality of life literature in bipolar disorder. *Qual Life Res.* 2001;10(2):105-15.
- Nelson DL, Cox MM. *Lehninger Principles of Biochemistry.* 3ª ed. New York: Worth Publishers; 2000. p.1152.
- Neto JG, Junior MSC, Hubner CK. Escala de Depressão de Hamilton (HAM-D): Revisão dos 40 anos de sua utilização. *Ver Fac Ciênc Méd* 2001;3(1):10-4.
- Neto PRN, Carvalho AF. Manejo de casos refratários de transtorno bipolar. In: Kapczinski, F; Quevedo, J. editores. *Transtorno Bipolar. Teoria e clínica.* 2ª ed. Porto Alegre: Artmed; 2016. p. 320.
- Nicholls DG, Budd SL. Mitochondria and neuronal survival. *Physiol Rev.* 2000;80(1):315-60.
- Niizuma K, Yoshioka H, Chen H, Kim GS, Jung JE, Katsu M, Okami N, Chan PH. Mitochondrial and apoptotic neuronal death signaling pathways in cerebral ischemia. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1802(1):92-9.
- Novick DM, Swartz HA, Frank E. Suicide attempts in bipolar I and bipolar II disorder: a review and meta-analysis of the evidence. *Bipolar Disord.* 2010;12(1):1-9.

- Orrenius S, Gogvadze V, Zhivotovsky B. Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2007;47:143-183.
- Osoata GO, Yamamura S, Ito M, Vuppusetty C, Adcock IM, Barnes PJ, Ito K. Nitration of distinct tyrosine residues causes inactivation of histone deacetylase 2. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;384(3):366-71.
- Palmer CS, Osellame LD, Stojanovski D, Ryan MT. The regulation of mitochondrial morphology: intricate mechanisms and dynamic machinery. *Cell Signal.* 2011;23(10):1534-45.
- Pedrini M, Massuda R, Fries GR, de Bittencourt Pasquali MA, Schnorr CE, Moreira JC, Teixeira AL, Lobato MI, Walz JC, Belmonte-de-Abreu PS, Kauer-Sant'Anna M, Kapczinski F, Gama CS. Similarities in serum oxidative stress markers and inflammatory cytokines in patients with overt schizophrenia at early and late stages of chronicity. *J Psychiatr Res.* 2012;46(6):819-24.
- Pero RW, Roush GC, Markowitz MM, Miller DG. Oxidative stress, DNA repair, and cancer susceptibility. *Cancer Detect Prev.* 1990;14(5):555-61.
- Pfaffenseller B, Wollenhaupt-Aguiar B, Fries GR, Colpo GD, Burke RK, Bristot G, Ferrari P, Ceresér KM, Rosa AR, Klamt F, Kapczinski F. Impaired endoplasmic reticulum stress response in bipolar disorder: cellular evidence of illness progression. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2014;17(9):1453-63.
- Pieczynek SR, Neustadt J. Mitochondrial dysfunction and molecular pathways of disease. *Exp Mol Pathol.* 2007;83(1):84-92.
- Pinsonneault JK, Han DD, Burdick KE, Kataki M, Bertolino A, Malhotra AK, Gu HH, Sadee W. Dopamine transporter gene variant affecting expression in human brain is associated with bipolar disorder. *Neuropsychopharmacology.* 2011;36(8):1644-55.
- Pompili M, Gonda X, Serafini G, Innamorati M, Sher L, Amore M, Rihmer Z, Girardi P. Epidemiology of suicide in bipolar disorders: a systematic review of the literature. *Bipolar Disord.* 2013;15(5):457-90.
- Quiroz JA, Gray NA, Kato T, Manji HK. Mitochondrially mediated plasticity in the pathophysiology and treatment of bipolar disorder. *Neuropsychopharmacology.* 2008;33(11):2551-65.
- Rajkowska G. Cell pathology in mood disorders. *Semin Clin Neuropsychiatry.* 2002;7(4):281-92.
- Rao KM, Padmanabhan J, Kilby DL, Cohen HJ, Currie MS, Weinberg JB. Flow cytometric analysis of nitric oxide production in human neutrophils using dichlorofluorescein diacetate in the presence of a calmodulin inhibitor. *J Leukoc Biol.* 1992;51(5):496-500.

- Rivett AJ. Regulation of intracellular protein turnover: covalent modification as a mechanism of marking proteins for degradation. *Curr Top Cell Regul.* 1986;28:291-337.
- Rizzo LB, Costa LG, Mansur RB, Swardfager W, Belangero SI, Grassi-Oliveira R, McIntyre RS, Bauer ME, Brietzke E. The theory of bipolar disorder as an illness of accelerated aging: implications for clinical care and research. *Neurosci Biobehav Rev.* 2014;(42):157-69.
- Rustin P, Lebidois J, Chretien D, Bourgeron T, Piechaud JF, Rötig A, Munnich A, Sidi D. Endomyocardial biopsies for early detection of mitochondrial disorders in hypertrophic cardiomyopathies. *J Pediatr.* 1994;124(2): 224-8.
- Sarkar A, Bhaduri A. Black tea is a powerful chemopreventor of reactive oxygen and nitrogen species: comparison with its individual catechin constituents and green tea. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;284(1):173-8.
- Scaini G, Rezin GT, Carvalho AF, Streck EL, Berk M, Quevedo J. Mitochondrial dysfunction in bipolar disorder: Evidence, pathophysiology and translational implications. *Neurosci Biobehav Rev.* 2016;68:694-713.
- Schloesser RJ, Martinowich K, Manji HK. Mood-stabilizing drugs: mechanisms of action. *Trends Neurosci.* 2012;35(1):36-46.
- Soeiro-de-Souza MG, Gold PW, Brunoni AR, de Sousa RT, Zanetti MV, Carvalho AF, Gattaz WF, Machado-Vieira R, Teixeira AL. Lithium decreases plasma adiponectin levels in bipolar depression. *Neurosci Lett.* 2014;564:111-4.
- Steckert AV, Valvassori SS, Moretti M, Dal-Pizzol F, Quevedo J. Role of oxidative stress in the pathophysiology of bipolar disorder. *Neurochem Res.* 2010;35(9):1295-301.
- Subramaniam M, Abdin E, Vaingankar JA, Nan L, Heng D, Mccrone P, Chong SA. Impact of psychiatric disorders and chronic physical conditions on health-related quality of life: Singapore Mental Health Study. *J Affect Disord.* 2013;147(1-3):325-30.
- Talaei A, Pourgholami M, Khatibi-Moghadam H, Faridhosseini F, Farhoudi F, Askari-Noghani A, Sadeghi R. Tamoxifen: A Protein Kinase C Inhibitor to Treat Mania: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized, Placebo-Controlled Trials. *J Clin Psychopharmacol.* 2016;36(3):272-5.
- Tohen M, Vieta E. Antipsychotic agents in the treatment of bipolar mania. *Bipolar Disord.* 2009;11(2):45-54.
- Valvassori SS. Consolidação de um modelo animal de transtorno bipolar induzido pela administração intracerebroventricular de ouabaína em ratos

- [tese de doutorado]. Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde. Criciúma: Universidade do Extremo Sul Catarinense; 2014.
- Vasconcelos SML, Goulart MOF, Moura JBF, Manfredini V, Benfato MS, Kubota LT. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Química Nova*. 2007;30(5):1323-38.
- Vélot C, Srere PA. Reversible transdominant inhibition of a metabolic pathway. In vivo evidence of interaction between two sequential tricarboxylic acid cycle enzymes in yeast. *J Biol Chem*. 2000;275(17):12926-33.
- Vilela JAA, Crippa JAS, Del-Ben CM, Loureiro SR. Reliability and validity of a Portuguese version of the Young Mania Rating Scale. *Braz J Med Biol Res*. 2005;38(9):1429-39.
- Voet D, Voet JG. *Biochemistry*. 2<sup>a</sup> ed. New York: John Wiley & Sons;1995.
- Wallace DC. Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* 1999;283(5407):1482-8.
- Wang JF, Shao L, Sun X, Young LT. Increased oxidative stress in the anterior cingulate cortex of subjects with bipolar disorder and schizophrenia. *Bipolar Disord*. 2009;11(5):523-9.
- Wyss M, Schulze A. Health implications of creatine: can oral creatine supplementation protect against neurological and atherosclerotic disease? *Neuroscience*. 2002;112(2):243-60.
- Yatham LN, Fountoulakis KN, Rahman Z, Ammerman D, Fyans P, Marler SV, Baker RA, Carlson BX. Efficacy of aripiprazole versus placebo as adjuncts to lithium or valproate in relapse prevention of manic or mixed episodes in bipolar I patients stratified by index manic or mixed episode. *J Affect Disord*. 2013;147(1-3):365-72.
- Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev*. 1994;74(1):139-62.
- Yuksel C, Du F, Ravichandran C, Goldbach JR, Thida T, Lin P, Dora B, Gelda J, O'Connor L, Sehovic S, Gruber S, Ongur D, Cohen BM. Abnormal high-energy phosphate molecule metabolism during regional brain activation in patients with bipolar disorder. *Mol Psychiatry*. 2015;20(9):1079-84.
- Zarate CA jr, Singh J, Manji HK. Cellular plasticity cascades: targets for the development of novel therapeutics for bipolar disorder. *Biological Psychiatry*. 2006;59(11):1006-20.

Zendjidjian X, Richieri R, Adida M, Limousin S, Gaubert N, Parola N, Lançon C, Boyer L. Quality of life among caregivers of individuals with affective disorders. *J Affect Disord.* 2012;136(3):660-5.

## APÊNDICES



## **APÊNDICE 1 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Estamos realizando um Projeto de Pesquisa intitulado “Estudo das alterações no metabolismo energético e estresse oxidativo em partículas submitocondriais de linfócitos de pacientes ambulatoriais com transtorno bipolar”. O (a) sr(a). foi plenamente esclarecido de que participando deste projeto, estará participando de um estudo de cunho acadêmico, que tem como objetivo “Avaliar as alterações no metabolismo energético e estresse oxidativo e nitrosativo em partículas submitocondriais de linfócitos de pacientes ambulatoriais com transtorno bipolar”. Embora o (a) sr(a) venha a aceitar a participar neste projeto, estará garantido que o (a) sr (a) poderá desistir a qualquer momento bastando para isso informar sua decisão. Foi esclarecido ainda que, por ser uma participação voluntária e sem interesse financeiro o (a) sr (a) não terá direito a nenhuma remuneração. Os dados referentes ao sr (a) serão sigilosos e privados, preceitos estes assegurados pela Resolução nº 196/96 versão 2012 do Conselho Nacional de Saúde, sendo que o (a) sr (a) poderá solicitar informações durante todas as fases do projeto, inclusive após a publicação dos dados obtidos a partir desta. Mesmo não tendo benefícios diretos em participar, indiretamente você estará contribuindo para a compreensão do fenômeno estudado e para a produção de conhecimento científico.

Quaisquer dúvidas relativas à pesquisa poderão ser esclarecidas pelo(s) pesquisador(es) no telefone (48) 3431 2618 ou pela entidade responsável do Comitê de Ética da Unesc no telefone (48) 3431 2723.

Professores responsáveis: João Quevedo e Samira Valvassori

**Atenciosamente,**

\_\_\_\_\_  
Nome e assinatura do(a) pesquisador

\_\_\_\_\_  
Nome e assinatura do(a) prof

**Consinto em participar deste estudo e declaro ter recebido uma cópia deste termo de consentimento.**

\_\_\_\_\_  
Nome do(a) participante

**Criciúma (SC) de de 201\_.**

**ANEXOS**

# ANEXO 1 - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA UNESC



## Universidade do Extremo Sul Catarinense UNESC Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

### Resolução

Comitê de Ética em Pesquisa, reconhecido pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/Ministério da Saúde analisou o projeto abaixo.

Projeto: 16/2010

### Pesquisador:

Rafael Riegel

Gustavo Feier

**Título:** "Estudo das alterações no metabolismo energético e estresse oxidativo em partículas mitocondriais de pacientes ambulatoriais com transtorno bipolar do humor".

Este projeto foi Aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos, de acordo com as Diretrizes e Normas Internacionais e Nacionais. Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicado ao CEP. Os membros do CEP não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores

Criciúma, 16 de junho de 2010.

*Mágada T. Schwalm*

Coordenadora do CEP

## Parecer Consubstanciado de Projeto de Pesquisa

**Título do Projeto:** Estudo das alterações no metabolismo energético e estresse oxidativo em partículas submitocondriais de pacientes ambulatoriais com transtorno bipolar do humor

**Pesquisador Responsável:** Rafael Ernesto Riegel

Data da Versão

Cadastro 16

Data do Parecer

**Grupo e Área Temática:** III - Projeto fora das áreas temáticas especiais

**Objetivos do Projeto**

**Sumário do Projeto**

Itens Metodológicos e Éticos	Situação
Título	Adequado
Autores	Adequados
Local de Origem na Instituição	Adequado
Projeto elaborado por patrocinador	Não
Aprovação no país de origem	Não necessita
Local de Realização	Outro (citar no comentário)
Outras instituições envolvidas	Sim
Condições para realização	Adequadas

Comentários sobre os itens de Identificação

Introdução	Adequada
Comentários sobre a Introdução	

Objetivos	Adequados
Comentários sobre os Objetivos	

Pacientes e Métodos	
Delineamento	Adequado
Tamanho de amostra	Total 100 Local
Cálculo do tamanho da amostra	Adequado
Participantes pertencentes a grupos especiais	Não
Seleção equitativa dos indivíduos participantes	Adequada
Critérios de inclusão e exclusão	Adequados
Relação risco-benefício	Não apresentada
Uso de placebo	Não utiliza
Período de suspensão de uso de drogas (wash out)	Não utiliza
Monitoramento da segurança e dados	Adequado
Avaliação dos dados	Adequada - quantitativa
Privacidade e confidencialidade	Adequada
Tempo de Consentimento	Comentário
Adequação às Normas e Diretrizes	Sim

Comentários sobre os itens de Pacientes e Métodos

Cronograma	Adequado
Data de início prevista	
Data de término prevista	
Orçamento	Adequado
Fonte de financiamento externa	Não informado

Comentários sobre o Cronograma e o Orçamento

Referências Bibliográficas	Adequadas
----------------------------	-----------

## Comentários sobre as Referências Bibliográficas

Recomendação

**Aprovar**

Comentários Gerais sobre o Projeto



## ANEXO 2 - ESCALA DE MANIA DE YOUNG

### Young Mania Rating Scale (Young, 1978)

#### ESCALA DE MANIA DE YOUNG

Todos os itens devem ser preenchidos. Assinalar o número apropriado. Avalie a gravidade dos sintomas no período dos últimos sete dias. Se o paciente se sentiu melhor nos últimos 3 dias, considere os 4 anteriores e pontue considerando a média da intensidade e da frequência dos sintomas durante toda a semana.

**1. 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 discreto ou possivelmente aumentados, quando questionado.
- (2) Relato subjetivo de elevação clara de 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.

**2. 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 não ser acalmado).
- (4) Excitação motora; hiperatividade contínua (mas não pode ser acalmado).
- (X) Não avaliado

**3. Interesse sexual:** este item compreende ideias 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

**4. 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 a necessidade de sono.
- (X) Não avaliado.

**5. 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) Subjetividade 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.

**6. 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.

**7. 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 em 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 ideias:** verbalizações rápidas e contínuas, ou jogos de palavras que produzem uma constante mudança de uma ideia para a outra; as ideias 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 frequentemente; pensamentos muito acelerados.

(3) Fuga de ideias; tangencialidade; dificuldade para acompanhar o pensamento, ecolalia consonante.

(4) Incoerência; comunicação impossível.

(X) Não avaliado.

**8. Conteúdo:** este item compreende ideias e crenças apresentadas pelo paciente, variando, de acordo com a intensidade, de ideias novas e/ou incomuns ao paciente, ideiação supervalorizada (ou seja, crença falsa, intencionalmente 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:

**Ideias místicas:** de conteúdo religioso.

**Ideias paranoides:** crença de estar sendo molestado ou perseguido.

**Ideias de grandeza:** concepção exagerada da própria importância, poder ou identidade, incluindo posses materiais, qualidades incomuns e relacionamentos especiais com personalidades famosas ou identidades místicas.

**Ideias 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) Ideias supervalorizadas.

(8) Delírios.

(X) Não avaliado.

**9. 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.

## **ANEXO 3 – ESCALA DE AVALIAÇÃO DE DEPRESSÃO DE HAMILTON**

### **GUIA DE ENTREVISTA ESTRUTURADA PARA ESCALA DE AVALIAÇÃO DE DEPRESSÃO DE HAMILTON**

*Structured Interview Guide for the Hamilton Depression Rating Scale (Sigh-D)*  
– Williams (1988)

#### **Entrevistador:**

A primeira questão para cada item deve ser feita exatamente como está escrita. Frequentemente essa pergunta ira extrair informações sobre a gravidade e a frequência de um sintoma. As questões especificadas devem ser usadas até haver informação suficiente para se avaliar o item com segurança. Em alguns casos, você pode ter de adicionar suas próprias perguntas para obter as informações necessárias.

#### **Notas:**

Período de tempo:

Embora as perguntas indiquem que as avaliações devem se basear nas condições do paciente na última semana, alguns investigadores, podem desejar, como uma medida de mudança, basear suas avaliações nos últimos dois ou três dias; desse modo, as perguntas devem ser procedidas por “Nós últimos dois dias...”.

#### **Item perda de peso:**

Recomenda-se que esse item seja avaliado positivamente sempre que o paciente tenha perdido peso em relação ao seu peso habitual (i.e., antes do episódio depressivo atual), a não ser que ele tenha começado a readquirir o peso perdido. No entanto, uma vez que o paciente comece a ganhar peso, mesmo que ainda esteja abaixo de seu peso habitual, ele não deve ser avaliado positivamente nesse item.

#### **Referente ao funcionamento habitual:**

Muitas das perguntas da entrevista referem-se ao funcionamento habitual do paciente. Em alguns casos, quando, por exemplo, o paciente apresenta distímia ou transtorno afetivo sazonal, o referencial deve ser a última vez em que esteve bem (ou seja, nem deprimido nem eufórico) por pelo menos algumas semanas.

## **GUIA DA ENTREVISTA ESTRUTURADA PARA A ESCALA DE AVALIAÇÃO DE DEPRESSÃO HAMILTON**

### **Introdução**

Gostaria de lhe fazer algumas perguntas sobre a última semana. Como você tem se sentido desde a última (dia da semana)? Se paciente ambulatorial: você tem trabalhado? Se não: especifique por que não?

**1- Como tem estado o seu humor na última semana?**

Você tem se sentido para baixo ou deprimido?

Triste? Sem esperança?

Na última semana, com que frequência você se sentiu (utilize a palavra referida pelo paciente)? Todos os dias? O dia inteiro? Você tem chorado?

**HUMOR DEPRESSIVO** (tristeza, desesperada, desamparo, inutilidade)

0 ( ) Ausente.

1 ( ) Sentimentos relatados somente se perguntados.

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 ( ) O paciente comunica quase exclusivamente esses sentimentos, tanto em seu relato verbal como na comunicação não-verbal.

Se pontuou de 1-4, pergunte: há quanto tempo você tem se sentido dessa maneira?

**2- Você tem se sentido especialmente autocrítico nesta última semana, sentindo que fez coisas erradas ou decepcionou outras pessoas.**

SE SIM: Quais foram esses pensamentos?

Você tem se sentido culpado em relação a coisas que fez ou não fez?

Você tem pensado que, de alguma forma, você é responsável pela sua depressão?

Você sente que está sendo punido ficando doente?

**SENTIMENTO DE CULPA**

0 ( ) Ausente.

1 ( ) Auto-recriminação, acha que decepcionou outras pessoas.

2 ( ) Ideias de culpa ou rumações de erros ou ações pecaminosas (más) no passado.

3 ( ) Paciente acha que a doença é uma punição (castigo). Delírio de culpa.

4 ( ) Ouve vozes que o acusam ou denunciam e/ou tem alucinações visuais ameaçadoras.

**3- Nesta última semana, você teve pensamentos de que não vale a pena viver ou que você estaria melhor morto? Ou pensamentos de se machucar ou até de se matar?**

SE SIM: O que tem pensamento sobre isso? Você já se machucou?

**SUICÍDIO**

0 ( ) Ausente.

1 ( ) Acha que não vale a pena viver.

2 ( ) Deseja estar morto ou pensa em uma possível morte para si.

3 ( ) Ideias ou atitudes suicidas.

4 ( ) Tentativas de suicídio.

**4- Como tem sido seu sono na última semana?**

Você tem alguma dificuldade em iniciar o sono? Após se deitar, quanto tempo leva para conseguir dormir?

Em quantas noites nessa última semana você teve problemas para iniciar o sono?

### **INSÔNIA INICIAL**

0 ( ) Sem dificuldades para iniciar o sono.

1 ( ) Queixa de dificuldade ocasional para iniciar o sono, ou seja, mais que meia hora.

2 ( ) Queixa-se de dificuldade para iniciar o sono todas noites.

### **5- Durante esta última semana, você tem acordado no meio da noite?**

SE SIM: Você sai da cama? O que você faz? (somente vai ao banheiro?)

Quando volta para a cama, você volta a dormir logo?

Você sente que seu sono é agitado ou perturbado em algumas noites?

### **INSÔNIA INTERMEDIÁRIA**

0 ( ) Sem dificuldade.

1 ( ) Queixa de agitação e perturbação durante a noite.

2 ( ) Acorda durante a noite - qualquer saída da cama (exceto por motivos de necessidades biológicas).

### **6- A que horas você tem acordado pela manhã na última semana?**

Se cedo: Acorda com o despertador ou sozinho? A que horas você normalmente acorda (ou seja, antes de ficar deprimido)?

### **INSÔNIA TARDIA**

0 ( ) Sem dificuldade.

1 ( ) Acorda durante a madrugada, mas volta dormir.

2 ( ) Não consegue voltar a dormir se levantar da cama durante a noite.

### **7- Como você tem passado seu tempo na última semana (quando não está no trabalho)?**

Você se sente interessado em saber (essas atividades) ou você tem que se forçar?

Você parou de fazer atividades que costumava fazer? SE SIM: por quê?

Há alguma coisa que você aguarda ansiosamente?

(no segmento): Seu interesse voltou ao normal?

### **TRABALHO E ATIVIDADES**

0 ( ) Sem dificuldades.

1 ( ) Pensamentos e sentimentos de incapacidade, fadiga ou fraqueza, relacionados a atividades, trabalhos ou passatempos.

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

3 ( ) Diminuição no tempo gasto em atividades ou queda de produtividade. No hospital, o paciente se ocupa por menos de três horas por dia em atividades (trabalho hospitalar ou passatempos), com exceção das tarefas rotineiras da enfermaria.

4 ( ) Parou de trabalhar devido à doença atual. No hospital, sem atitudes, com exceção das tarefas rotineiras da enfermagem, ou se não consegue realiza-las sem ajuda.

### **8- Avaliação baseada na observação durante a entrevista.**

**RETARDO** (lentificação do pensamento e da fala, dificuldade de concentração, diminuição da atividade motora)

- 0 ( ) Pensamento e fala normal.
- 1 ( ) Lentificação discreta à entrevista.
- 2 ( ) Lentificação óbvia durante à entrevista.
- 3 ( ) Entrevista difícil.
- 4 ( ) Estupor completo.

### **9. Avaliação baseada na observação durante a entrevista.**

#### **AGITAÇÃO**

- 0 ( ) Nenhuma.
- 1 ( ) Inquietação.
- 2 ( ) Mexe as mãos, cabelos, etc.
- 3 ( ) Movimenta-se bastante, não consegue permanecer sentado durante a entrevista.
- 4 ( ) Retorce as mãos róí as unhas, puxa os cabelos, morde os lábios.

### **10 - Você tem se sentido especialmente tenso ou irritado nesta última semana?**

Você tem estado preocupado com coisas pouco importantes, com as quais normalmente não se preocuparia? SE SIM: com o que, por exemplo?

#### **ANSIEDADE PSÍQUICA**

- 0 ( ) Sem dificuldade.
- 1 ( ) Tensão e irritabilidade subjetivas.
- 2 ( ) Preocupa-se com trivialidades.
- 3 ( ) Atitude apreensiva aparente no rosto ou na fala.
- 4 ( ) Paciente expressa medo sem ser perguntado.

### **11- Na última semana, você sofreu de alguns dos seguintes sintomas físicos?**

Leia a lista, parando após cada sintoma para a resposta.

O quanto esses sintomas o incomodaram na última semana? Quão intensos foram? Quanto tempo ou que com frequência os teve?

Nota: não considerar se claramente relacionados à medicação (por exemplo, boca seca e imipramina)

#### **ANSIEDADE – SOMÁTICA**

Concomitantes fisiológicos da ansiedade, como:

- ( ) GI: boca seca, flatulência, indigestão, diarreias, cólicas, eructações.
- ( ) CV: palpitação, cefaleias.
- ( ) Respiratórios: hiperventilação, suspiros.

( ) Sudorese.

0 ( ) Ausente.

1 ( ) Duvidosos ou trivial: sintomas menores, relatados quando questionados.

2 ( ) Leve: paciente descreve espontaneamente os sintomas, que não são acentuados ou incapacitantes.

3 ( ) Moderada: mais que 2 sintomas e com maior frequência. São acompanhados de estresse subjetivo e prejudicam o funcionamento normal.

4 ( ) Grave: numerosos sintomas, persistentes e incapacitantes na maior parte do tempo, ou ataques de pânico quase diariamente.

**12- Como tem estado seu apetite nesta última semana? ( Como se compara ao seu apetite habitual?)**

Você tem tido de se forçar a comer?

As outras pessoas têm de insistir pra você comer?

**SINTOMAS SOMÁTICOS – GASTRINTESTINAIS**

0 ( ) Nenhum.

1 ( ) Perda de apetite, mas come sem necessidade de insistência.

2 ( ) Dificuldade para comer se não insistirem.

**13 - Como tem estado sua “energia” nesta última semana?**

Você se sente cansado o tempo todo?

Nesta última semana, você teve dor nas costas, dor de cabeça ou dor muscular?

Nesta última semana, você tem sentido um peso nos membros, nas costas ou na cabeça?

**SINTOMAS SOMÁTICAS – GERAIS**

0 ( ) Nenhum.

1 ( ) Peso em membros, costas ou cabeça; dor nas costas, cabeça ou muscular.

Perda de energia e fadigabilidade.

2 ( ) Qualquer sintoma bem caracterizado e nítido.

**14 – Como tem estado seu interesse por sexo nesta semana? (não estou lhe perguntando sobre seu desempenho sexual, mas sobre seu interesse por sexo, isto é, quanto você tem pensado nisso?)**

Houve alguma mudança em seu interesse por sexo (relação à época em que você não estava deprimido)?

Isso é algo em que você tem pensado muito? Se não: isso é pouco habitual para você?

**SINTOMAS GENITAIS (como perda de libido, distúrbios menstruais).**

0 ( ) Ausentes.

1 ( ) Leves ou infrequentes: perda de libido, desempenho sexual prejudicado.

2 ( ) Óbvio e graves: perda completa do interesse.

**15 – Na última semana, quanto seus pensamentos têm focalizado na sua saúde física ou no funcionamento do seu corpo (comparado ao seu pensamento habitual)**

Você se queixa muito de sintomas físicos?

Você tem-se deparado com situações em que pede ajuda para fazer coisas que poderia fazer sozinho?

SE SIM: Como o que, por exemplo? Com que frequência isso tem ocorrido?

### **HIPOCONDRIA**

0 ( ) Ausente.

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

2 ( ) Preocupação com a saúde.

3 ( ) Queixas frequentes, pedidos de ajuda, etc.

4 ( ) Delírios hipocondríacos.

### **16 – Você perdeu algum peso desde que essa (DEPRESSÃO) começou? SE SIM: Quando?**

SE INCERTO: Você acha que suas roupas estão mais folgadas?

NO SEGUIMENTO: Você voltou a ganhar peso?

**PERDA DE PESO** (desde o início da doença ou última avaliação):

0 ( ) Sem perda de peso ou perda de peso NÃO causada pela doença atual.

1 ( ) Perda de peso provavelmente causada pela doença atual. Perda de menos de meio quilo.

2 ( ) Perda de peso definitivamente causada pela doença atual. Perda de meio quilo ou mais.

### **17 – Avaliação baseada na observação.**

#### **CRÍTICA (CONCIÊNCIA DA DOENÇA)**

0 ( ) Reconhece estar deprimido e doente OU não estar deprimido no momento.

1 ( ) Reconhece estar, mas atribui a causa a má alimentação, ao clima, ao excesso de trabalho, a um vírus, à necessidade de descanso, etc.

2 ( ) Nega estar doente.

### **ESCORE TOTAL HAM-17 ITENS**

### **18 – Nesta última semana você se sentiu melhor ou pior em algum período específico do dia – manhã ou noite.**

SE VARIAÇÃO: Quanto pior você se sente (de MANHÃ ou de NOITE)?

SE INDECISO: Um pouco pior ou muito pior?

#### **VARIAÇÃO DIURNA**

A. Anote se os sintomas são piores de manhã ou à noite. SE NÃO HOUVER variação diurna, marque nenhuma:

( ) Sem variação ou não deprimido no momento.

( ) Pior pela manhã.

( ) Pior à tarde/à noite

B. Quando presente, anote a gravidade da variação:

0 ( ) Nenhuma.

1 ( ) Leve.

2 ( ) Grave.

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

**19 - Na última semana, você teve subitamente a sensação de que tudo é irreal, ou que você está em um sonho, ou separado do contato das outras pessoas de uma maneira estranha?**

Alguma situação de flutuação?

SE SIM: Quanto ruim isso tem sido? Quantas vezes isso aconteceu nesta última semana?

**DESPERSONALIZAÇÃO E DESREALIZAÇÃO** (como sensação de irrealidade e ideias niilistas)

0 ( ) Ausentes.

1 ( ) Leves.

2 ( ) Moderadas.

3 ( ) Graves.

4 ( ) Incapacitantes.

**20 - Na última semana, você sentiu que alguém tentou te prejudicar ou te machucar?**

SE NÃO: E sobre alguém falando de você pelas costas?

SE SIM: Fale mais sobre isso.

**SINTOMAS PARANÓIDES**

0 ( ) Nenhum.

1 ( ) Desconfiado.

2 ( ) Ideias de referência.

3 ( ) Delírios de referência e perseguição.

**21 - Na última semana, você teve que fazer alguma coisa várias vezes? Houve algo que você teve de fazer e refazer várias vezes, como checar se as portas estão fechadas?**

SE SIM: Você pode me dar um exemplo?

Você teve algum pensamento que não faz sentido para você, mas que fica voltando na sua cabeça sempre, sem parar?

SE SIM: Você pode me dar um exemplo?

**SINTOMAS OB SESSIVOS COMPULSIVOS**

0 ( ) Nenhum.

1 ( ) Leves.

2 ( ) Graves.

**ESCORE TOTAL HAM DE 21 ITENS.**



**Dissertação de Mestrado**

**ALTERAÇÕES MITOCONDRIAIS EM LINFÓCITOS DE  
PACIENTES COM TRANSTORNO BIPOLAR DURANTE  
EPISÓDIO DEPRESSIVO**

**DANIELA VICENTE BAVARESCO**

**UNIVERSIDADE  
DO EXTREMO SUL CATARINENSE  
UNIDADE ACADÊMICA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em  
Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense para  
obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.  
Orientadora: Profa. Dra. Samira da Silva Valvassori  
Coorientador: Prof. Dr. João Luciano de Quevedo

Criciúma, 2017