

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA

Giovana Bristot

**BIOMARCADORES PERIFÉRICOS E REGULAÇÃO TRANSCRICIONAL NOS
TRANSTORNOS PSIQUIÁTRICOS: VIAS MOLECULARES ASSOCIADAS À
PSICOPATOLOGIA NO TRANSTORNO BIPOLAR, TRANSTORNO DEPRESSIVO
MAIOR E ESQUIZOFRENIA**

Porto Alegre

2022

Giovana Bristot

**BIOMARCADORES PERIFÉRICOS E REGULAÇÃO TRANSCRICIONAL NOS
TRANSTORNOS PSIQUIÁTRICOS: VIAS MOLECULARES ASSOCIADAS À
PSICOPATOLOGIA NO TRANSTORNO BIPOLAR, TRANSTORNO DEPRESSIVO
MAIOR E ESQUIZOFRENIA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Bioquímica.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Márcia Kauer Sant'Anna

Porto Alegre

2022

CIP - Catalogação na Publicação

Bristot, Giovana
Biomarcadores periféricos e regulação
transcricional nos transtornos psiquiátricos: vias
moleculares associadas à psicopatologia no Transtorno
Bipolar, Transtorno Depressivo Maior e Esquizofrenia /
Giovana Bristot. -- 2022.
193 f.
Orientadora: Márcia Kauer Sant'Anna.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2022.

1. Biomarcadores periféricos. 2. Regulação
transcricional. 3. Transtorno Bipolar. 4. Transtorno
Depressivo Maior. 5. Esquizofrenia. I. Kauer
Sant'Anna, Márcia, orient. II. Título.

Giovana Bristot

**BIOMARCADORES PERIFÉRICOS E REGULAÇÃO TRANSCRICIONAL NOS
TRANSTORNOS PSIQUIÁTRICOS: VIAS MOLECULARES ASSOCIADAS À
PSICOPATOLOGIA NO TRANSTORNO BIPOLAR, TRANSTORNO DEPRESSIVO
MAIOR E ESQUIZOFRENIA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Bioquímica.

Aprovado em: ____ de _____ de ____.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Carmem Juracy Silveira Gottfried – PPG Bioquímica/UFRGS

Prof^a Dr^a Adriane Ribeiro Rosa – PPG Farmacologia e Terapêutica/UFRGS

Prof. Dr. Raffael Massuda – PPG Medicina Interna e Ciências da Saúde/UFPR

Prof. Dr. Rafael Colombo – PPG Biotecnologia e PPG Ciências da Saúde/UCS (suplente)

Prof^a. Dr^a. Márcia Kauer Sant’Anna - PPG Bioquímica/UFRGS (orientadora)

... A todos os pacientes psiquiátricos e seus familiares.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof^ª Márcia Kauer-Sant'Anna, pela confiança, por acreditar nas minhas ideias, aperfeiçoá-las e proporcionar as condições para que pudessem ser executadas. Obrigada também pela compreensão, pelos diálogos motivacionais e pelo constante estímulo para sempre alçar voos mais altos, seguindo na direção dos sonhos pessoais.

Aos demais professores do Laboratório de Psiquiatria Molecular pelas discussões científicas sempre muito valiosas e que foram de grande importância para a minha formação ao longo desses anos.

Ao Marco Antônio De Bastiani pela parceria imprescindível, pelas trocas de ideias e por todo o empenho e dedicação na realização das análises de bioinformática.

Ao Hugo Bock, com quem aprendi muito do que sei hoje de PCR em tempo real. Obrigada pela disponibilidade, pelas explicações didáticas e pelo auxílio essencial para que parte desta tese pudesse ser realizada.

Aos queridos amigos do laboratório pelas ajudas diárias, parceria, descontração e troca de ideias. Um agradecimento especial ao Gabriel Hizo e à Gabriela Possebon, pela contribuição essencial na execução dos experimentos de bancada; ao Jacson Feiten pelo auxílio fundamental na organização do banco dados e na realização das análises finais. Aos demais amigos e colegas - Bárbara Antqueviezc, Diego Rabelo, Fernanda Valiati, Giovana Dalpiaz, Jairo Vinícius Pinto, Mailton Vasconcelos, Paola Ziani e Rafael Colombo - obrigada pelo companheirismo de sempre e por tornarem os dias mais leves em meio aos desafios que enfrentamos na pesquisa.

À Bianca Pfaffenseller, minha amiga e irmã espiritual, que mesmo distante está sempre presente, compartilhando sua experiência e sabedoria. Obrigada pela amizade, por todos os momentos de conversa, pelas palavras de incentivo e por toda ajuda na realização deste trabalho.

À Bianca Aguiar, pelo incentivo desde meus primeiros momentos como IC no laboratório, pelas discussões e pela amizade. À Ellen Scotton, pela parceria, pelo estímulo e pelas conversas sempre muito pertinentes para amenizar as angústias que por vezes surgiam.

Às amigas Suelen Fernandes e Thaís, pelos momentos de descontração, risadas, parceria e conversas. À amiga Suelen Baggio, pela convivência, trocas de experiências, desabafos e apoio. À minha vizinha Margarete, por todo carinho e cuidado típico de avó que teve comigo nesses últimos anos.

Aos funcionários da Unidade de Pesquisa Laboratorial do HCPA, por estarem sempre dispostos a auxiliar na execução dos experimentos e resolução de problemas. À professora Sandra Segal, por gentilmente ter disponibilizado o equipamento para que fosse possível finalizar os experimentos. Ao HCPA por proporcionar um ambiente de excelência em pesquisa.

Ao Departamento de Bioquímica e ao PPG em Bioquímica pela formação de excelência. Em especial, agradeço à Cleia e ao Giordano pela disponibilidade e pela gentileza ao longo desses anos.

Aos pacientes, aos seus familiares e aos controles que acreditaram na pesquisa e voluntariamente aceitaram participar deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA) pelo apoio financeiro ao projeto.

À minha família pelo incentivo, pelo suporte e pela compreensão, especialmente nos momentos em que estive mais ausente. Agradeço à minha mãe Melania, ao meu pai Dirceo, ao meu irmão Diego, à minha cunhada Fabieli, à minha avó Justina, ao meu afilhado Miguel e à Hágata pelo amor, carinho e apoio de sempre. O meu muito obrigado também ao meu avô Izalino (*in memoriam*), que sempre me apoiou e foi uma das primeiras pessoas a me ensinar

que a busca pelo conhecimento sempre valerá a pena. Obrigada, família, por serem sempre meu porto seguro!

La science, mon garçon, est faite d'erreurs, mais d'erreurs qu'il est bon de commettre, car elles mènent peu à peu à la vérité.

[A ciência, meu rapaz, é feita de erros, mas de erros benéficos, já que conduzem pouco a pouco à verdade].

(Jules Gabriel Verne)

APRESENTAÇÃO

Essa tese tem como propósito estudar a psicopatologia de transtornos psiquiátricos sob diferentes perspectivas complementares: 1) Sintomas: estudar em detalhe os sintomas frequentes e comuns a mais de um diagnóstico, como a ruminação, buscando um refinamento diagnóstico, assim como os fatores clínicos e neurobiológicos associados; 2) Assinaturas biológicas: examinar a possibilidade de marcadores periféricos serem específicos de um diagnóstico e capazes de diferenciar de controles, como na depressão; 3) Bases moleculares comuns: o estudo transdiagnóstico utilizando biologia de sistemas (abordagem transcriptômica) em nível de sistema nervoso central, complementado pelo estudo da expressão gênica periférica nos mesmos diagnósticos. Para tal, a presente tese de doutorado está organizada em três partes, conforme a seguir:

Parte I: Resumo, Resumo em inglês (abstract), Lista de ilustrações, Lista de tabelas, Lista de abreviaturas e siglas, Introdução e Objetivos;

Parte II: Resultados, os quais se encontram divididos em capítulos e são apresentados na forma de quatro artigos científicos: O primeiro, intitulado “*Decoding rumination: A machine learning approach to a transdiagnostic sample of outpatients with anxiety, mood and psychotic disorders*”, avaliou variáveis clínicas, sociodemográficas, e biológicas (marcadores séricos) que pudessem prever níveis maiores de ruminação mal adaptativa em uma amostra transdiagnóstica de pacientes psiquiátricos; o segundo, intitulado “*Differential biomarker signatures in unipolar and bipolar depression: a machine learning approach*”, avaliou o desempenho de biomarcadores inflamatórios, de estresse oxidativo e do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) para diferenciar pacientes com depressão bipolar de pacientes com depressão unipolar e de controles saudáveis; no terceiro artigo, intitulado “*Gene Regulatory Network of Dorsolateral Prefrontal Cortex: A Master Regulator Analysis of Major*

Psychiatric Disorders”, exploramos o Transtorno Bipolar (TB), Transtorno Depressivo Maior (TDM) e a Esquizofrenia (SZ) a partir de uma abordagem transcriptômica em nível central utilizando biologia de sistemas; por fim, no quarto e último capítulo, intitulado “*Early growth response 1 (EGR1) is downregulated in peripheral blood from patients with major psychiatric disorders*” investigamos a expressão de genes de interesse em nível periférico no TB, TDM e SZ.

Parte III: Discussão, Conclusão, Referências citadas na Parte I e na Parte III, e Anexos.

A seção de Anexos compreende: a) Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa (Anexo A); b) artigos científicos publicados em autoria ou coautoria durante o período do doutorado, os quais não estão diretamente associados ao tema da tese (Anexo B).

Os trabalhos que compõem esta tese foram desenvolvidos entre os anos de 2017 e 2022 no Laboratório de Psiquiatria Molecular, localizado no Centro de Pesquisas Experimentais do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), sob orientação da Prof^a. Dr^a. Márcia Kauer Sant’Anna. Este estudo foi apoiado pelos fundos brasileiros MCT/CNPq INCT-TM (465458/2014-9) e FIPE-HCPA.

SUMÁRIO

PARTE I..... 1

RESUMO 2

ABSTRACT..... 3

LISTA DE ILUSTRAÇÕES 4

LISTA DE TABELAS 5

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS 6

1 INTRODUÇÃO 10

 1.1 TRANSTORNOS PSIQUIÁTRICOS 10

 1.1.1 Transtorno Bipolar 12

 1.1.2 Esquizofrenia..... 14

 1.1.3 Transtorno Depressivo Maior..... 15

 1.2 ABORDAGEM TRANSDIAGNÓSTICA NO ESTUDO DOS TRANSTORNOS MENTAIS. 16

 1.3 ESTUDOS POST-MORTEM 18

 1.4 BIOMARCADORES PERIFÉRICOS 20

 1.5 GENÉTICA DOS TRANSTORNOS PSIQUIÁTRICOS 23

 1.5.1 Estratégias para o estudo da genética nos transtornos mentais 23

 1.5.2 Estudos de genética nos transtornos mentais 25

 1.6 BIOLOGIA DE SISTEMAS 29

 1.6.1 Redes regulatórias transcricionais 33

 1.6.2 Análise de reguladores mestres 35

 1.6.3 Análise de enriquecimento funcional 38

 1.7 JUSTIFICATIVA..... 40

2 OBJETIVOS 41

 2.1 OBJETIVO GERAL 41

 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 41

PARTE II 43

3 ARTIGOS CIENTÍFICOS 44

 3.1 CAPÍTULO 1 44

 3.2 CAPÍTULO 2 52

 3.3 CAPÍTULO 3 63

 3.4 CAPÍTULO 4 86

PARTE III 129

4. DISCUSSÃO..... 130

5. CONCLUSÃO	146
6. PERSPECTIVAS	147
REFERÊNCIAS	149
ANEXOS.....	165
ANEXO A: Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa - Projeto 2019-0025.....	165
ANEXO B: Artigos científicos publicados em autoria ou coautoria durante o período do doutorado, os quais não estão relacionados diretamente à tese.....	172

PARTE I

Introdução e Objetivos

RESUMO

Dados mostram que existe certa sobreposição de características clínicas e de resposta ao tratamento nos transtornos psiquiátricos, como Transtorno Bipolar (TB), Transtorno Depressivo Maior (TDM) e Esquizofrenia (SZ), sugerindo a existência de certos mecanismos fisiopatológicos similares. Os estudos contidos nesta tese tiveram como objetivo investigar biomarcadores periféricos em transtornos mentais, bem como características clínicas comuns entre eles, além de explorar, como foco principal, a regulação transcricional no TB, TDM e SZ. Neste sentido, no primeiro capítulo estudamos a utilização de biomarcadores séricos, além de variáveis clínicas e sociodemográficas, na predição de níveis de ruminação mal adaptativa em uma amostra transdiagnóstica através de análises de *machine learning*. Observamos que somente algumas variáveis clínicas e demográficas apresentaram associação significativa com os níveis de ruminação, não sendo encontrada relação com os biomarcadores séricos estudados. No segundo capítulo, utilizando algoritmos de *machine learning*, a proposta foi verificar a utilidade de marcadores inflamatórios, de estresse oxidativo e do BDNF para discriminar entre pacientes com depressão unipolar, depressão bipolar e controles, e constatamos que IL-4, TBARS e IL-10 representam as variáveis mais relevantes na distinção entre depressão bipolar e depressão unipolar; IL-6, IL-4, TBARS, carbonil e IL17-A tiveram destaque para distinguir depressão bipolar e controles; e IL-6, carbonil, BDNF, IL-10, IL17-A, IL-4 e TNF- α demonstraram ser capazes de distinguir entre depressão unipolar e controles. A partir de então, com o intuito de investigar as bases fisiopatológicas do TB, TDM e SZ em nível central, utilizamos uma abordagem transcriptômica valendo-nos de dados de microarranjo e RNA-Seq. No capítulo 3, identificamos potenciais genes que atuam como reguladores mestres (MRs) no córtex pré-frontal para cada um dos três transtornos, bem como o estado de ativação (ativado ou reprimido) de cada um deles, e usamos essas informações para análises de clusterização que pudessem caracterizar os fenótipos das doenças, além de determinar os processos biológicos modulados pelos MRs. Assim, identificamos três grandes grupos: (1) TDM, (2) majoritariamente TB, e (3) TB e SZ. TB e SZ compartilharam diversos processos biológicos relacionados a transporte e homeostase de íons, função sináptica e função imunológica; SZ particularmente mostrou também enriquecimento de processos relativos ao citoesqueleto e estrutura neuronal; e TDM foi relacionado a processos ligados a desenvolvimento glial e metabolismo de ácidos graxos. Ainda, entre os MRs identificados, o *early growth response* (EGR) 3 estava reprimido e o EGR1 predominantemente reprimido nos três transtornos e, por este motivo, investigamos no capítulo quatro, a expressão gênica de EGR1 e EGR3 periféricamente de maneira mais direcionada, assim como do gene *cryptochrome circadian regulator 2* (CRY2) que atua no ritmo circadiano e possui relação com os EGRs. Encontramos uma redução na expressão gênica de EGR1 no TB, TDM e SZ, corroborando com os achados em nível central do capítulo três, o que o coloca em destaque como um alvo molecular transdiagnóstico. Em conjunto, os resultados sugerem que há unidades gênicas regulatórias disfuncionais no córtex pré-frontal de pacientes com TB, TDM e SZ, sendo que o padrão de regulação transcricional e processos biológicos associados aproximam TB e SZ, ou seja, torna mais complexa a distinção entre estes dois transtornos, e os distancia do TDM. Nesta tese, identificamos o EGR1 como unidade regulatória de destaque, com evidências centrais e periféricas de que este regulon está reprimido nesses três transtornos psiquiátricos, o que deve ser ressaltado considerando que o EGR1 responde a estímulos ambientais (como experiências sociais, estresse, tarefas cognitivas) e, por meio dos seus alvos, atua em vias de sinalizações relacionadas à plasticidade sináptica. Em suma, a utilização de biomarcadores séricos para caracterizar transtornos psiquiátricos constitui um campo desafiador, sendo que combinar dados clínicos com dados de genômica e/ou transcriptômica em modelos de análise mais complexos tem o potencial de contribuir para o entendimento da fisiopatologia desses transtornos multifatoriais.

ABSTRACT

Evidence shows some overlapping of clinical symptoms and response to treatment in psychiatric disorders, such as Bipolar Disorder (BD), Major Depressive Disorder (MDD), and Schizophrenia (SZ), also suggesting similar underlying pathophysiological mechanisms. This thesis comprises studies with the aim to investigate peripheral biomarkers in mental disorders and common clinical characteristics among them, as well as exploring, as its main focus, the transcriptional regulation in BD, MDD, and SZ. In this sense, in the first chapter we studied the use of peripheral biomarkers, in addition to clinical and sociodemographic variables, to predict maladaptive rumination levels in a transdiagnostic sample using machine learning analyses. We found that only some clinical and demographic variables, and not the assessed serum biomarkers, were associated with rumination levels. In the second chapter, using machine learning algorithms, we proposed to evaluate whether inflammatory and oxidative stress markers, and BDNF could be used to discriminate patients with unipolar depression, patients with bipolar depression and controls; we found that IL-4, TBARS and IL-10 are the most relevant variables to differentiate bipolar depression and unipolar depression; IL-6, IL-4, TBARS, carbonil and IL17-A were relevant to distinguish between bipolar depression and controls; and IL-6, carbonil, BDNF, IL-10, IL17-A, IL-4 and TNF- α were able to discriminate unipolar depression from controls. Therefore, aiming to investigate the physiopathological basis of BD, MDD and SZ at the central level, we applied a transcriptomic approach using microarray and RNA-Seq data. In the chapter three, we identified potential genes acting as master regulators (MRs) in the prefrontal, as well as their pattern of activation (activate or repressed) in the three disorders, and we used these information in cluster analyses to characterize the disease phenotypes, and to assess the biological processes modulated by the MRs. Then, we identified 3 major clusters: (1) MDD, (2) mostly BD, and (3) TB and SZ. BD and SZ share biological processes related to ionic transport and homeostasis, synaptic function, and immune function; SZ particularly also shows enrichment of processes related to glial development and fatty acids metabolism. Also, among the identified MRs, the *early growth response* (EGR) 3 was repressed and the EGR1 was mostly repressed in the three disorders. Thus, we investigated, in the chapter four, the gene expression of EGR1 and EGR3 in the periphery, as well as the *cryptochrome 2* (CRY2) that is a circadian rhythm gene and associated with the EGRs. We found reduction in EGR1 gene expression in BD, MDD and SZ, supporting the findings at the central level found in the chapter three, which suggests this gene as a transdiagnostic molecular target. Altogether, the results suggest that there are dysfunctional gene regulatory units in the prefrontal cortex of patients with BD, MDD and SZ, with similar transcriptional regulation patterns and their related biological processes in BD and SZ, which makes more complex the discrimination between these two disorders. In this thesis, we identified EGR1 as a key regulatory unit, with central and peripheral evidence that this regulon is repressed in these three psychiatric disorders, which is crucial considering that EGR1 is highly responsive to environmental stimuli (as social experiences, stress, and cognitive tasks) and plays relevant roles, through its targets, in signaling pathways linked to synaptic plasticity. In sum, the use of serum biomarkers to characterize psychiatric disorders represent a great challenge in the field and integrating clinical data with genomic or transcriptomic data using more complexes approaches has a substantial potential to contribute to the understanding of the physiopathology of these multifactorial disorders.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Anos de vida perdidos por morte prematura ou por incapacidade em decorrência de transtornos mentais no Brasil.	11
Figura 2 – Suicídio e transtornos mentais: distribuição dos diagnósticos na população em geral.	12
Figura 3 – Representação gráfica da abordagem Rdoc	18
Figura 4 – Correlações genéticas entre transtornos psiquiátricos	28
Figura 5 – Pirâmide de complexidade biológica: do particular ao universal	31
Figura 6 – Cascata ômica	32
Figura 7 – Representação geral de engenharia reversa de redes regulatórias transcricionais...	34
Figura 8 – Topologia de redes regulatórias gênicas	35
Figura 9 – Representação da regulação e das funções do EGR1 no sistema nervoso central no contexto da plasticidade sináptica	141

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Herdabilidade estimada do Transtorno Bipolar, Esquizofrenia e Transtorno Depressivo Maior em estudos de famílias e de gêmeos	26
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ARACNE** algoritmo para a reconstrução de redes celulares acuradas (do inglês *algorithm for the reconstruction of accurate cellular networks*)
- BDNF** fator neurotrófico derivado do encéfalo (do inglês *brain-derived neurotrophic factor*)
- ChIP-seq** imunoprecipitação de cromatina seguida de sequenciamento (do inglês *Chromatin Immunoprecipitation Sequencing*)
- CGI-S** Escala de impressão clínica global (do inglês *Clinical Global Impression Scale*)
- CMAP** Mapa de conectividade (do inglês *Connectivity Map*)
- CPF** córtex pré-frontal
- CREB** proteína de ligação ao elemento de resposta do AMPc (do inglês *cAMP response element-binding protein*)
- CRY2** *cryptochrome circadian regulator 2*
- DALY** anos de vida perdidos ajustados por incapacidade (do inglês *disability-adjusted life years*)
- DSM** Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (do inglês *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*)
- EGR** resposta de crescimento precoce (do inglês *early growth response*)

ERK	cinase regulada por sinais extracelulares (do inglês <i>extracellular signal-regulated kinase</i>)
GABRA	receptor de ácido gama-aminobutírico A (do inglês <i>gamma aminobutyric acid A receptor</i>)
GAD-7	Escala de Transtorno de Ansiedade Generalizada 7 (do inglês <i>Generalized Anxiety Disorder-7</i>)
GEO	<i>Gene Expression Omnibus</i>
GO	<i>Gene Ontology</i>
GSEA	análise de enriquecimento de um conjunto de genes (do inglês <i>Gene Set Enrichment Analysis</i>)
GWAS	estudos de associação genômica ampla (do inglês <i>genome-wide association studies</i>)
HDRS	Escala de avaliação de Depressão de Hamilton (do inglês <i>Hamilton Depressive Rating Scale</i>)
HPA	hipotálamo-hipófise-adrenal (do inglês <i>hypothalamic–pituitary–adrenal</i>)
IEG	gene de ativação imediata (do inglês <i>immediate early gene</i>)
IL	Interleucina
JNK	c-Jun N-terminal cinase (do inglês <i>c-Jun N-terminal kinase</i>)
LTP	potenciação de longa duração (do inglês <i>long term potentiation</i>)

MAPK	proteína cinase ativada por mitógeno (do inglês <i>mitogen-activated protein kinase</i>)
MR	regulador mestre (do inglês <i>master regulator</i>)
MRA	análise de regulador mestre (do inglês <i>master regulator analysis</i>)
MSK	cinase ativada por mitógeno e pelo estresse (do inglês <i>mitogen and stress-activated kinase</i>)
NMDA	N-metil-D-aspartato (do inglês <i>N-methyl-D-aspartate</i>)
OMS	Organização Mundial da Saúde
PKC	proteína cinase C (do inglês <i>protein kinase C</i>)
PMI	intervalo <i>post-mortem</i> (do inglês <i>post-mortem interval</i>)
PSWQ	<i>Penn States Worry Questionnaire</i>
PUFAs	ácidos graxos poli-insaturados (do inglês <i>polyunsaturated fatty acids</i>)
RDoC	<i>Research Domain Criteria</i>
RNA-Seq	Sequenciamento de RNA
RSK	proteína ribossomal S6 cinase (do inglês <i>ribosomal S6 kinase</i>)
SNC	sistema nervoso central
SNP	polimorfismo de nucleotídeo único (do inglês <i>single nucleotide polymorphism</i>)
SRE	elemento sérico de resposta (do inglês <i>serum response element</i>)
SRF	fator sérico de resposta (do inglês <i>serum response factor</i>)

SZ	Esquizofrenia
TA	Transtornos de Ansiedade
TB	Transtorno Bipolar
TBARS	substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (do inglês <i>thiobarbituric acid reactive substances</i>)
TDAH	Transtorno de Déficit de Atenção com Hiperatividade
TDM	Transtorno Depressivo Maior
TEPT	Transtorno de Estresse Pós-Traumático
TF	fator de transcrição (do inglês <i>transcription factor</i>)
TNF	fator de necrose tumoral (do inglês <i>tumor necrosis factor</i>)
TOC	Transtorno Obsessivo Compulsivo
TRN	rede regulatória transcricional (do inglês <i>transcriptional regulatory network</i>)
YLD	anos vividos com incapacidade (do inglês <i>years lived with disability</i>)

1 INTRODUÇÃO

1.1 TRANSTORNOS PSIQUIÁTRICOS

Os transtornos mentais são doenças altamente incapacitantes, de curso crônico e que geralmente estão associadas a maiores índices de morbidade e mortalidade. Em 1998, com a publicação do primeiro estudo relativo à Carga Global de Doença, esses transtornos destacaram-se como um grave problema de saúde pública. Os resultados desse estudo mostraram que, em nível mundial, entre as dez principais causas de anos vividos com incapacidade (YLD) cinco pertenciam à categoria dos transtornos mentais: transtornos depressivos, transtornos decorrentes do uso de álcool, Esquizofrenia (SZ), Transtorno Bipolar (TB) e Transtorno Obsessivo Compulsivo (TOC) (LOPEZ; MURRAY, 1998). Já um levantamento posterior mostrou que os transtornos mentais foram responsáveis por 22,9% do total de YLD e por 7,4% do total de anos de vida perdidos ajustados por incapacidade (DALY), colocando-os como a primeira causa de YLD e a quinta maior de DALY no mundo (WHITEFORD et al., 2013). A Figura 1 traz uma representação dos dados referentes aos anos de vida perdidos por incapacidade ou morte prematura em decorrência de transtornos mentais no Brasil (BONADIMAN et al., 2017).

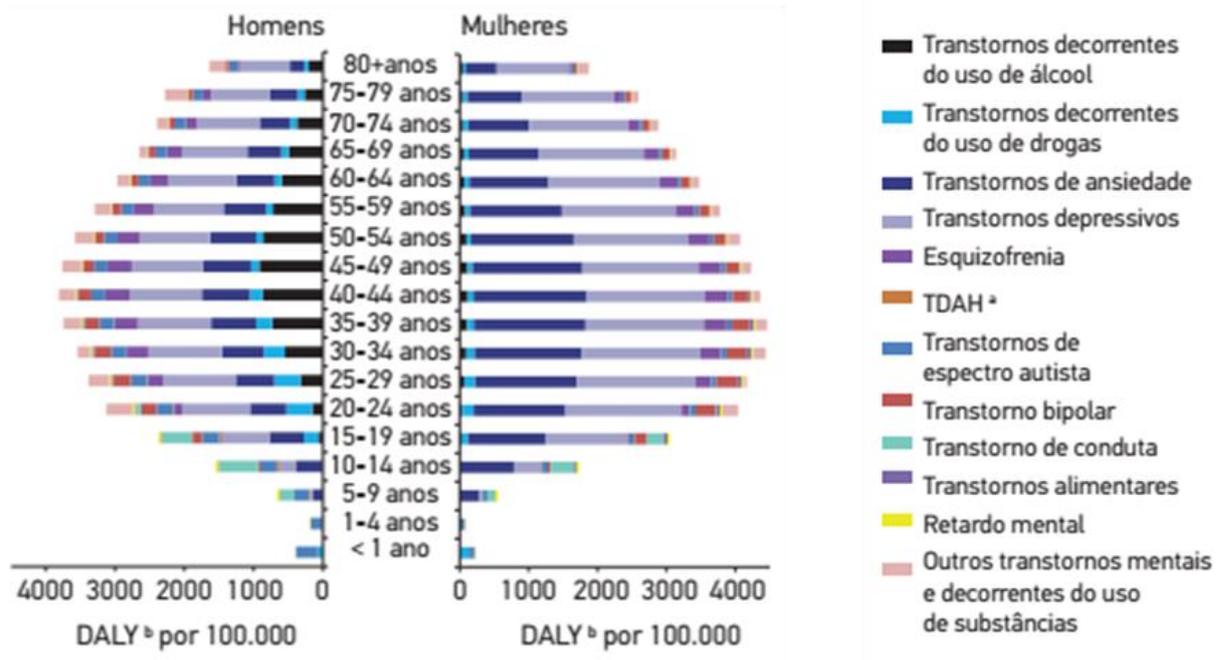


Figura 1. Anos de vida perdidos por morte prematura ou por incapacidade em decorrência de transtornos mentais no Brasil. Taxas referentes aos DALY para cada transtorno mental ou decorrente do uso de substâncias psicoativas, por sexo e em diferentes faixas etárias. DALY, anos de vida perdidos ajustados por incapacidade. Adaptado de Bonadiman *et al.*, 2017.

Dentre os transtornos mentais, nesta tese serão abordados em especial o TB, a SZ e o Transtorno Depressivo Maior (TDM), os quais são altamente prevalentes, com sintomas incapacitantes e não raramente culminando com suicídio. A associação destes transtornos com desfechos graves como o suicídio reforça a necessidade de atenção médica, de saúde pública e de pesquisa. A Figura 2 ilustra esta associação, na qual é possível verificar que, globalmente, cerca de 50% dos casos de suicídio estão relacionados aos transtornos de humor (tais como TB e TDM) e à SZ (BERTOLOTE; FLEISCHMANN, 2002).

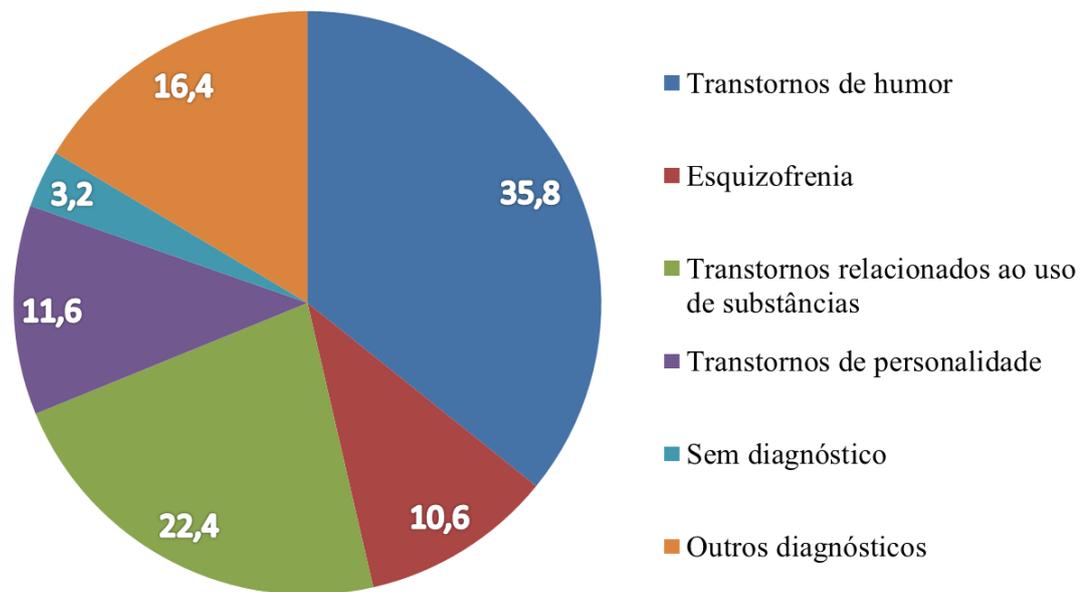


Figura 2. Suicídio e transtornos mentais: distribuição dos diagnósticos na população em geral. Dados originados de uma revisão que incluiu 31 artigos, publicados entre 1959 e 2001 em todo o mundo. No total, foram incluídos 15629 casos de suicídio da população em geral (indivíduos acima de 10 anos de idade, de ambos os sexos). Adaptado de Bertolote e Fleischmann, 2002.

Nos últimos anos, o estudo sobre a neurobiologia desses transtornos tem crescido, trazendo importantes avanços para a compreensão dessas doenças, cujas causas podem ser consideradas multifatoriais, englobando tanto fatores genéticos como ambientais (DARBY; YOLKEN; SABUNCIYAN, 2016). No entanto, a fisiopatologia desses transtornos ainda não está completamente elucidada e a pesquisa científica continua sendo de extrema relevância para impulsionar o conhecimento nesta área.

1.1.1 Transtorno Bipolar

O TB é uma doença psiquiátrica crônica caracterizada por oscilações de humor entre episódios de mania ou hipomania e depressão. Nos últimos anos, tem sido observado um aumento na prevalência do TB em nível global, sendo que hoje estima-se que 1-4 % da população é afetada pelo transtorno (SAUNDERS; GEDDES, 2016).

O episódio maníaco consiste em um estado de humor persistentemente elevado, expansivo ou irritável e aumento da energia ou da atividade dirigida a objetivos, com duração mínima de uma semana ou se houver necessidade de hospitalização (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014). Em geral, o indivíduo em episódio maníaco apresenta sintomas como desorganização e impulsividade comportamentais, energia em alta, agitação psicomotora, redução significativa da necessidade de sono, autoestima inflada ou grandiosidade, fuga de ideias e envolvimento excessivo em atividades com elevado potencial para consequências dolorosas (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014). A hipomania, por sua vez, consiste em um estado de euforia com sintomas semelhantes à mania, porém com alterações mais moderadas e duração mínima de quatro dias, geralmente não envolvendo um estado severo a ponto de causar prejuízos funcionais acentuados no âmbito familiar, social e ocupacional ou haver necessidade de internação (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014; BELMAKER, 2004).

Em contrapartida, durante episódios depressivos, o indivíduo encontra-se melancólico e pessimista, além de poder exibir comportamentos e pensamentos lentificados, sensação de fadiga, queixas de ordem somática, desinteresse por atividades as quais habitualmente lhe dariam prazer, aumento ou redução do sono, baixa autoestima e ideação suicida (BELMAKER, 2004; SUPPES; DENNEHY, 2009). Entre a ocorrência dos episódios maníacos ou hipomaníacos e depressivos, o indivíduo com TB passa por períodos de eutímia, caracterizados por serem períodos em que o paciente apresenta remissão dos sintomas e permanece com o humor estável (SOUZA, 2005).

Quanto à fisiopatologia, o TB tem como contribuintes tanto fatores herdados como baseados em experiências, sendo que os últimos – em que se incluem trauma psicológico no início da vida, insultos fisiológicos (e.g. infecções do sistema nervoso central (SNC), uso ou abuso de drogas e trauma cerebral ou vascular) - são melhores compreendidos do que os

primeiros (BOWDEN, 2008). Alterações têm sido relatadas em vias biológicas envolvidas com sistemas de neurotransmissores, neurotrofinas, inflamação, sinalização de cálcio, estresse oxidativo e nitrosativo, desregulação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), transporte e bioenergética celular, cronobiologia, entre outras (SIGITOVA et al., 2017). No entanto, assim como para a maioria dos transtornos psiquiátricos, diversos genes de suscetibilidade de baixo efeito já foram identificados, porém até o momento não são conhecidos marcadores biológicos específicos para o TB (HARRISON; GEDDES; TUNBRIDGE, 2018).

1.1.2 Esquizofrenia

A SZ afeta cerca de 1% da população mundial - em sua grande maioria jovens – sendo que a literatura relata um aumento na incidência e prevalência da SZ entre os homens, além de evolução mais severa da doença em comparação com as mulheres (ANDREASEN, 2000; THOMAS et al., 2010). Os indivíduos acometidos geralmente desenvolvem alucinações, desorganização da fala e do comportamento, além de apresentarem redução da interação social e prejuízos cognitivos importantes. Esses sintomas são classificados em positivos, negativos e cognitivos, e caracterizam a SZ como uma doença altamente debilitante (ANDREASEN, 2000).

Os sintomas positivos refletem um excesso ou distorção de funções normais e estão relacionados a distorções do pensamento, da percepção, da linguagem e do processo cognitivo, além da perda do autocontrole do comportamento (HALLAK; CHAVES; ZUARDI, 2009). Em contrapartida os sintomas negativos se referem, por exemplo, ao embotamento afetivo e perda de fluência verbal, enquanto os sintomas cognitivos envolvem diminuição da lógica do pensamento e da memória, além de dificuldade em realizar tarefas que exijam planejamento e organização (HALLAK; CHAVES; ZUARDI, 2009).

Atualmente a SZ é caracterizada como um transtorno psiquiátrico cuja causa ainda não é completamente esclarecida, e evidências mostram que essa doença pode ser entendida como um transtorno heterogêneo com variações em sua fisiopatologia, o que dificulta a formulação

de uma única hipótese etiológica para o seu desenvolvimento (HALLAK; CHAVES; ZUARDI, 2009). A literatura apresenta resultados que sugerem que a SZ seja decorrente de um conjunto de fatores genéticos e ambientais (complicações da gravidez e do parto, infecção viral *in utero*, abuso de drogas, entre outros); e de alterações neuroquímicas, neuroanatômicas, neurofisiológicas e neuroimunológicas, que se apresentam de maneiras distintas entre os indivíduos acometidos, justificando o grande espectro de sintomas (positivos, negativos ou cognitivos) (DEBNATH; CANNON; VENKATASUBRAMANIAN, 2013). Além disso, múltiplos genes de suscetibilidade já foram identificados na SZ, porém todos com baixo efeito e que provavelmente agem em conjunto com processos epigenéticos, o que aliado à ausência de um biomarcador e de uma neuropatologia diagnóstica dificulta a pesquisa por *loci* cromossômicos e genes individuais que expliquem a doença (HARRISON; OWEN, 2003; HENRIKSEN; NORDGAARD; JANSSON, 2017).

1.1.3 Transtorno Depressivo Maior

O TDM é uma doença altamente prevalente na população (COELHO et al., 2013). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que cerca de 300 milhões de pessoas sofram com a doença em todo o mundo, o que equivale a 4,4% da população mundial. No Brasil, a OMS estima que este transtorno mental afeta cerca de 5,8% da população do país (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

Este transtorno impacta o humor dos indivíduos, sendo que os sintomas podem variar no que diz respeito à intensidade (moderados a severos) e duração (de meses a anos). Os transtornos depressivos são caracterizados pela presença de tristeza, perda de interesse ou prazer, sentimento de culpa ou baixa autoestima, distúrbios no sono ou apetite e sentimentos de cansaço. O TDM pode ser duradoura ou recorrente, prejudicando consideravelmente as atividades no trabalho ou nos estudos ou a capacidade de lidar com situações diárias da vida,

podendo levar ao suicídio nos casos mais graves (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

A prevalência do transtorno depressivo maior é cerca de duas vezes mais comum em mulheres em relação aos homens (SCHUCH et al., 2014). No que diz respeito às comorbidades, também há uma diferença entre os gêneros: as mulheres com TDM apresentam níveis significativamente maiores de transtorno de ansiedade generalizada, bulimia e transtorno de somatização; já os homens com TDM geralmente são mais afetados por transtorno relacionado ao uso de substâncias (SCHUCH et al., 2014).

Assim como o TB e a SZ, o TDM também é um transtorno complexo de etiologia multifatorial e não totalmente compreendida, sendo explicada em parte por fatores genéticos – em geral diversos genes que podem conferir suscetibilidade ao desenvolvimento de TDM, porém de baixo efeito (SULLIVAN; NEALE; KENDLER, 2000) - e em parte por fatores ambientais, tais como eventos adversos na infância ou estresse relacionado a adversidades do dia a dia (e.g. abuso sexual e/ou psicológico ou outro tipo de trauma ao longo da vida, baixo suporte social, divórcio, entre outros) (HASLER, 2010). Alterações em sistemas de neurotransmissão, no ritmo circadiano, em fatores neurotróficos e em vias relacionadas ao estresse oxidativo e nitrosativo, bem como desregulação do eixo HPA e disfunção mitocondrial têm sido relatadas em pacientes depressivos (HASLER, 2010; MOYLAN et al., 2013).

1.2 ABORDAGEM TRANSDIAGNÓSTICA NO ESTUDO DOS TRANSTORNOS MENTAIS

A classificação dos transtornos psiquiátricos é uma ferramenta prática, pois permite estabelecer prognósticos e decidir sobre a necessidade e a escolha de um tratamento dependendo do diagnóstico. Atualmente, o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (5ª edição; DSM-5) é o referencial utilizado tanto na prática clínica quanto na pesquisa para realizar essa classificação (KUPFER; KUHL; REGIER, 2013). No entanto, um desafio

para o DSM reside no fato de os pacientes com transtornos mentais apresentarem altos índices de comorbidades, ou seja, a coexistência de duas ou mais condições ou transtornos (KESSLER et al., 2005).

Os transtornos mentais são classicamente agrupados e explicados em três dimensões: transtornos internalizantes, externalizantes e do pensamento. No entanto, Caspi e colegas propuseram que os transtornos psiquiátricos podem ser mais bem compreendidos adotando-se uma dimensão única, a de psicopatologia geral, a qual eles chamaram de fator p (CASPI et al., 2014). Desta forma, o fator p se resume a uma dimensão que une todos os transtornos e vias neurológicas. A existência deste fator poderia explicar a dificuldade em encontrar fatores etiológicos que confirmam risco diferencial para um transtorno específico, uma vez que todos os fatores de risco testados pelos autores foram associados com transtornos internalizantes, externalizantes e do pensamento (CASPI et al., 2014).

Além disso, o fator p explicaria o porquê da promiscuidade de marcadores biológicos nos transtornos psiquiátricos, ou seja, da falta de biomarcadores específicos para cada doença (CASPI et al., 2014). Sendo assim, a ideia do fator p na pesquisa da etiologia dos transtornos psiquiátricos vai ao encontro do proposto pelo *Research Domain Criteria (RDoC) Project*, o qual destaca que os estudos não devem ser limitados pelas categorias presentes no DSM, mas sim conduzidos com uma abordagem transdiagnóstica, considerando que os transtornos mentais são cerebrais e a psicopatologia é dimensional (SANISLOW et al., 2010). Neste sentido, a abordagem RDoC traz uma perspectiva interessante, uma vez que integra diversos níveis de informação, compreendendo fatores genéticos, ambientais, circuitos comportamentais e sintomas auto reportados, o que permite compreender a natureza de saúde e doença mental em graus variados de disfunção em sistemas psicobiológicos, como está representado na Figura 3 (NATIONAL INSTITUTE OF MENTAL HEALTH, 2021).

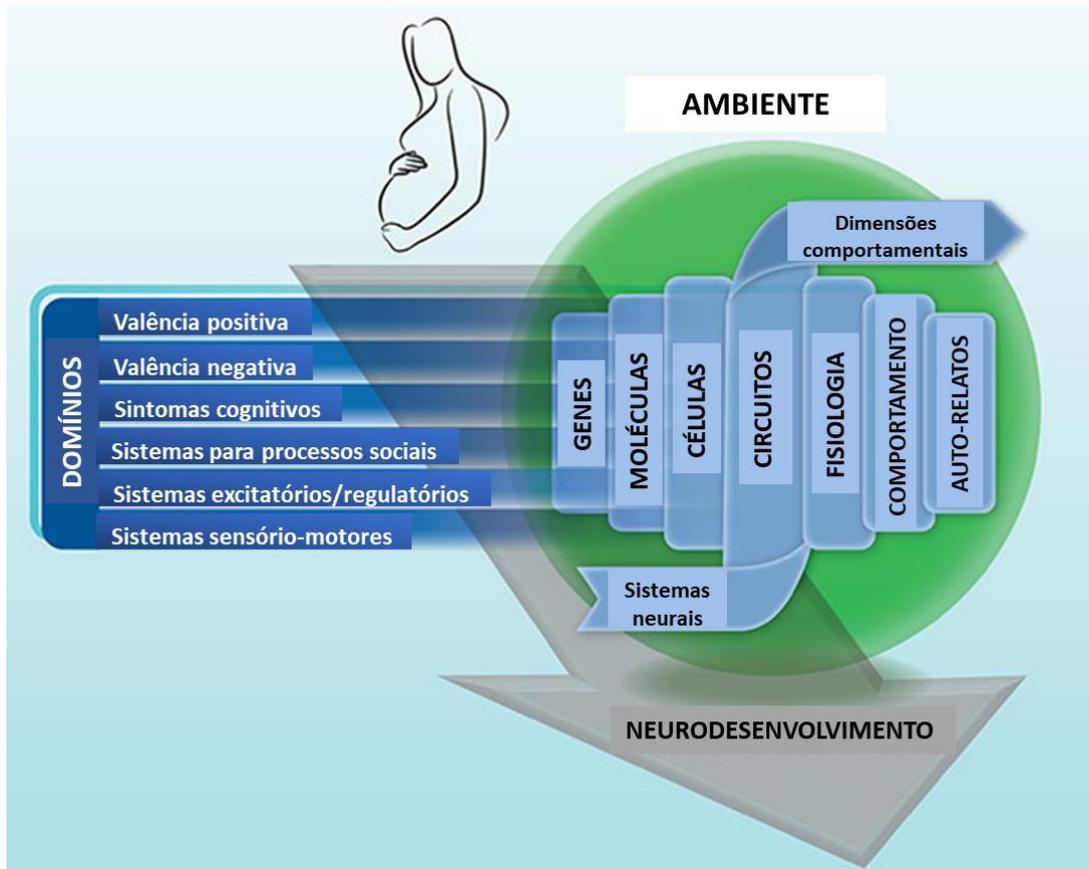


Figura 3. Representação gráfica da abordagem RDoC. Esta ferramenta destaca os seis principais domínios do funcionamento humano, integrando os diversos níveis de informação que permitem explorar as dimensões básicas do comportamento humano, destacando o papel de fatores biológicos e a influência do ambiente no funcionamento dos circuitos neurais, e que acaba refletindo nas dimensões comportamentais. Adaptado de *National Institute of Mental Health*.

1.3 ESTUDOS POST-MORTEM

Estudos sobre a neurobiologia dos transtornos psiquiátricos têm sido realizados principalmente em tecidos periféricos, devido à facilidade de obtenção dessas amostras quando comparada a tecidos do SNC. No entanto, muitas vezes fica o questionamento: as alterações encontradas na periferia refletem mudanças similares no cérebro e têm relevância para a neurobiologia dos transtornos mentais?

O tecido cerebral humano é o tecido mais relevante para o estudo de patologias associadas ao SNC. Assim, mesmo que haja dificuldades inerentes quanto à obtenção e uso de

tais amostras, estudos *post-mortem* são essenciais para identificar alterações patológicas. Com o surgimento de metodologias envolvendo técnicas “ômicas” - como genômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica – a utilização de tecido *post-mortem* para investigar a fisiopatologia dos transtornos mentais tem se expandido, uma vez que a determinação da expressão gênica e proteica em estados normais e patológicos do SNC é fundamental para a compreensão de várias doenças. A região do córtex pré-frontal (CPF) é alvo de diversos estudos que investigam a neurobiologia dos transtornos psiquiátricos, pois esta região é essencial para funções executivas superiores, sendo fundamental nos processos de julgamento, planejamento e tomada de decisão. Especificamente, tem sido sugerido que o CPF dorsolateral é responsável pela função cerebral executiva central (FUNAHASHI, 2001).

Estudos com tecido cerebral *post-mortem* precisam levar em consideração vários critérios. A fim de obter informação útil, é importante que a qualidade das amostras esteja em conformidade com certos padrões relacionados à integridade estrutural, bioquímica e molecular do tecido. Os seres humanos em si apresentam características diversas quanto à genética, etnia, influências ambientais e sociais, entre outros; além disso, cada autópsia é afetada por uma combinação de fatores *ante* e *post-mortem*. Alguns fatores que merecem consideração são: estado agonal; rapidez do óbito; intervalo de refrigeração; intervalo *post-mortem* (PMI); e tempo de armazenamento (HYND et al., 2003).

Análises neuroquímicas requerem DNA, RNA e proteínas razoavelmente intactos dos espécimes provenientes da autópsia. Ácidos nucleicos e proteínas com boa qualidade têm sido obtidos mesmo após períodos *post-mortem* superiores a 72 horas (BAHN et al., 2001; DAVIDSSON et al., 2001; JOHNSON; FERRIS, 2002). PMI e tempo de armazenamento parecem não afetar significativamente a integridade do material biológico, embora as características do tecido humano possam ser variáveis de acordo com os procedimentos realizados na coleta e processamento da amostra (BARTON et al., 1993).

No geral, ácidos nucleicos e proteínas são notavelmente estáveis após a morte (LUDES; PFITZINGER; MANGIN, 1993; YATES et al., 1990); e o estado agonal não afeta significativamente a concentração de RNA e de proteínas da autópsia, porém pode influenciar transcritos e proteínas específicos (HARRISON et al., 1991). Desta forma, as amostras *post-mortem* de cérebro devem ser bastante adequadas para realizar estudos consistentes. A maioria dos pesquisadores que utilizam amostras cerebrais *post-mortem* examinam a qualidade do tecido através da determinação do pH das amostras e da integridade do RNA.

1.4 BIOMARCADORES PERIFÉRICOS

Biomarcador consiste em uma característica que pode ser mensurada (i.e., uma molécula, estrutura física ou observação) e acessada por meio de um método analítico validado, o qual indica a presença de uma doença ou estado fisiológico, ou até mesmo uma resposta do organismo a determinado tratamento (MARTINS-DE-SOUZA, 2013). Hoje, não há qualquer marcador biológico disponível para os transtornos psiquiátricos, e isso pode ser explicado pelo fato de serem transtornos com determinantes multifatoriais, poligênicos (com cada gene tendo um pequeno efeito), e com o ambiente exercendo forte influência no estabelecimento da doença (MARTINS-DE-SOUZA, 2013). Desta forma, cada condição psiquiátrica pode ser vista como uma entidade heterogênea, e dificilmente existirá um marcador específico para cada transtorno. No entanto, painéis ou conjuntos de biomarcadores poderão representar avanços na determinação desses transtornos.

Nas últimas décadas, tem-se investigado moléculas periféricas distintas que demonstraram serem candidatas a biomarcadores de TB, SZ e TDM, destacando-se moléculas relacionadas ao sistema imunológico, neurotrofinas e marcadores de estresse oxidativo. No entanto, o que tem sido observado em diversos estudos é a existência de uma promiscuidade de biomarcadores periféricos nesses transtornos (PINTO; MOULIN; AMARAL, 2017).

Alterações nos níveis sanguíneos de componentes da rede de citocinas e no número de células do sistema imune, por exemplo, foram relatadas nessas três doenças (BARBOSA et al., 2014; GIBNEY; DREXHAGE, 2013; MILLER et al., 2013; MÜLLER, 2014). As citocinas são moléculas chave de sinalização no sistema imunológico, exercendo efeitos na periferia e no SNC, e têm papel essencial na regulação da inflamação aguda e crônica – um processo que impacta todos os sistemas do organismo. Uma metanálise conduzida por Goldsmith e colegas mostrou níveis elevados das citocinas interleucina (IL) 6 e fator de necrose tumoral (TNF) α , de IL-1RA (um antagonista de receptor de citocina - provavelmente refletindo um aumento na atividade da IL-1), e de sIL-2R (um receptor solúvel de citocina - possivelmente atuando de maneira contrarregulatória) nas três síndromes durante episódios agudos (GOLDSMITH; RAPAPORT; MILLER, 2016). Adicionalmente, mostraram que pacientes crônicos com TB, SZ e TDM possuem níveis de IL-6 aumentados significativamente, e que aqueles com TB e SZ também apresentam níveis elevados de IL-1 β e de sIL-2R (GOLDSMITH; RAPAPORT; MILLER, 2016). Assim, alterações nos níveis periféricos de citocinas em pacientes com TB, SZ e TDM são consistentes com um perfil inflamatório e de ativação de células T, e costuma-se observar, em geral, que quando esses pacientes estão sob tratamento ocorre uma redução nos níveis de citocinas com função proinflamatória, ao passo que há aumento nos níveis das citocinas anti-inflamatórias (GOLDSMITH; RAPAPORT; MILLER, 2016).

Ademais, o fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF), uma neurotrofina essencial para o desenvolvimento do sistema nervoso e desempenho cognitivo durante a vida adulta, é um fator que tem sido investigado em uma série de estudos relacionados a transtornos mentais, já tendo sido apontado como um potencial biomarcador de diagnóstico no TB, SZ e TDM (FERNANDES et al., 2014). A maioria dos estudos indica níveis de BDNF periférico (sérico ou plasmático) reduzidos em pacientes com essas condições, principalmente quando se encontram na fase aguda da doença (FERNANDES et al., 2011; GREEN et al., 2011;

MOLENDIJK et al., 2014), o que o destaca como um marcador de traço nesses transtornos. No entanto, os níveis de BDNF não possibilitam a diferenciação entre TB, SZ e TDM, sugerindo que o BDNF periférico pode ser visto como um biomarcador de atividade de doença, refletindo fisiopatologias comuns entre esses transtornos.

Mecanismos envolvendo estresse oxidativo também estão implicados na fisiopatologia dos transtornos psiquiátricos. Estudos publicados têm examinado predominantemente produtos da peroxidação lipídica e da oxidação do DNA como marcadores de dano oxidativo. Para avaliar peroxidação lipídica, ensaios que mensuram substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) – as quais são formadas a partir da decomposição de produtos instáveis de peroxidação lipídica - são largamente utilizados. Níveis elevados de TBARS no plasma, eritrócitos e leucócitos de pacientes esquizofrênicos (AKYOL et al., 2002; DIETRICH-MUSZALSKA; OLAS; RABE-JABLONSKA, 2005; HERKEN et al., 2001) foram reportados, bem como depleção de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) – os quais são altamente suscetíveis à peroxidação lipídica (NG et al., 2008; RANJEKAR et al., 2003). De maneira similar, em estudos com pacientes com TB e TDM também foi evidenciado aumento nos níveis periféricos de marcadores de peroxidação lipídica (ANDREAZZA et al., 2008; BILICI et al., 2001; BLACK et al., 2015), bem como depleção de PUFAs (RANJEKAR et al., 2003; RIEMER et al., 2010). Dano oxidativo ao DNA (NG et al., 2008; RAZA et al., 2016) e alterações nas defesas antioxidantes do organismo (NG et al., 2008) também já foram reportados nesses três transtornos.

Nesta busca por biomarcadores periféricos em transtornos neuropsiquiátricos, abordagens utilizando o perfil transcricional de genes em amostras periféricas têm sido empregadas, as quais poderiam prever alterações mais cedo do que aquelas evidenciadas por investigações em nível proteico (KÁLMÁN et al., 2005; MAES et al., 2007; MATSUBARA et al., 2006). O perfil de expressão gênica obtido do RNA de sangue total pode representar

vantagens no que diz respeito à descoberta de padrões aberrantes de regulação gênica, uma vez que o sangue total pode ser facilmente coletado por venopunção e que o sistema imune comunica-se com o SNC através de diversos mecanismos moleculares, hormonais e neurotransmissores (GLADKEVICH; KAUFFMAN; KORF, 2004). Inclusive, tem sido proposto que as células sanguíneas periféricas poderiam atuar como uma “janela” no SNC (BURCZYNSKI; DORNER, 2006; GLADKEVICH; KAUFFMAN; KORF, 2004). Assim sendo, relacionar esses achados na periferia com alterações em nível cerebral poderia auxiliar na identificação de potenciais biomarcadores para detecção, intervenção e tratamento de transtornos psiquiátricos.

1.5 GENÉTICA DOS TRANSTORNOS PSIQUIÁTRICOS

1.5.1 Estratégias para o estudo da genética nos transtornos mentais

As pesquisas cujo objetivo consiste no entendimento das bases genéticas dos transtornos psiquiátricos geralmente se valem de duas abordagens investigativas no campo da genética molecular: busca por genes candidatos e estudos de associação genômica ampla (GWAS). No primeiro caso, investiga-se a potencial implicação de um gene específico - de forma individual - na etiologia da doença. A seleção racional desses genes candidatos fundamenta-se em evidências clínicas, neuroquímicas e farmacológicas, as quais sugerem o envolvimento de determinados neurotransmissores, receptores, enzimas e outras moléculas que podem estar relacionadas à fisiopatologia dos transtornos. Neste sentido, os estudos de ligação e os estudos de associação têm sido classicamente utilizados na investigação de variações de DNA que podem resultar no desenvolvimento de doenças.

Os estudos de ligação baseiam-se no conceito de ligação gênica¹. Assim, se algum marcador genético, cuja localização é conhecida, for sempre herdado com a doença nas

¹ Ligação gênica: dois *loci* gênicos situados muito próximos em um determinado cromossomo tendem a ser herdados em conjunto (ligados) sem sofrerem influência de permutações gênicas (CANTOR, 2013).

famílias, é provável que o gene dessa doença esteja localizado nas vizinhanças do marcador (ROMANO-SILVA; NICOLATO; CORRÊA, 2011). Esse tipo de estudo está sendo cada vez menos utilizado para o entendimento da genética dos transtornos psiquiátricos, pois nos últimos anos tem-se observado que diversos genes estão implicados na fisiopatologia dessas doenças e, portanto, tais condições não apresentam um padrão de transmissão compatível com o conceito de herança mendeliana simples. Já os estudos de associação buscam verificar se a frequência de certo polimorfismo genético² ocorre com maior frequência em indivíduos afetados (doentes) em comparação com não afetados (controles) (ROMANO-SILVA; NICOLATO; CORRÊA, 2011). Deste modo, esta classe de estudos permite detectar se existe uma associação entre a condição de afetado e mutações em um gene específico. Esta é uma estratégia que possibilita a identificação de genes os quais possuem efeitos discretos na determinação de uma condição, tornando este tipo de estudo mais adequado quando se investiga a fisiopatologia de transtornos complexos, poligênicos e multifatoriais – como é o caso do TB, SZ e TDM.

Diferentemente das abordagens supracitadas - as quais se baseiam na análise de um ou de alguns genes específicos – estudos de GWAS focam na análise completa de todo o genoma. Esta estratégia permite analisar o envolvimento de diversos genes em um determinado fenótipo, ao invés de somente uma variação em uma sequência de DNA de um gene de forma isolada.

O projeto genoma humano - lançado em 1990 e tendo o primeiro rascunho e a análise inicial da sequência do genoma humano divulgados em 2001 - foi o responsável pelo advento de avanços tecnológicos sem precedentes no que concerne às tecnologias de análise de DNA e ao conhecimento do genoma humano (LANDER et al., 2001). Estudos de GWAS, introduzidos em 2006, trouxeram dados inéditos para a investigação das causas genéticas de enfermidades humanas. Um GWAS para determinada doença é geralmente uma variação de um estudo

² Polimorfismo genético pode ser definido como a ocorrência de múltiplos alelos em um mesmo *locus* gênico, em que pelo menos dois alelos ocorrem com uma frequência maior do que 1%, ou seja, o polimorfismo envolve uma de duas ou mais variantes de uma sequência de DNA em particular (SINGH, 2001).

transversal do tipo caso-controle; cada indivíduo é genotipado para um conjunto predefinido de marcadores genéticos distribuídos ao longo do genoma, conhecidos como polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) (SULLIVAN, 2010). Cada SNP é então testado para verificar sua associação com a doença de interesse; em suma, os testes comparam as frequências alélicas em casos *versus* controles, sendo que uma ampla diferença entre casos e controles sugere uma função etiológica para um SNP específico ou sua região genômica. O ingrediente crítico para o sucesso de um GWAS reside em um grande número de amostras para descoberta inicial e replicação. O n amostral desses estudos excede com frequência 10000 casos e 10000 controles, por isso a cooperação entre grupos (consórcios) é de fundamental importância para a realização de GWAS (SULLIVAN, 2010).

Além disso, nos últimos cinquenta anos houve um progresso substancial na associação de fenótipos comportamentais e psiquiátricos a aberrações cromossômicas ou alterações genéticas em nível de DNA (HEBE BRAND et al., 2010). Métodos de sequenciamento de nova geração, aliados a estudos genéticos de associação e de ligação, possibilitaram também um melhor entendimento acerca dos aspectos genéticos relacionados aos diferentes transtornos mentais (AVRAMOPOULOS, 2010), que muitas vezes compartilham sintomas similares e comorbidades, sugerindo a presença de uma sobreposição etiológica entre eles.

Métodos que visam o estudo da herdabilidade de doenças permitem a determinação acurada da correlação de variantes de risco comum em todo o genoma entre dois fenótipos (duas doenças diferentes, por exemplo). Uma vez que se tenha disponível dados de grupos distintos de indivíduos, pode-se acessar o quão conectados eles – ou pelo menos seus riscos genéticos – são em nível genômico (BRAINSTORM CONSORTIUM et al., 2018).

1.5.2 Estudos de genética nos transtornos mentais

Desde o surgimento dos primeiros estudos epidemiológicos até os estudos moleculares recentes com tecnologias avançadas, a genética dos transtornos psiquiátricos é reconhecida

como sendo de fundamental importância para o entendimento da fisiopatologia desses transtornos. Estudos baseados em genética de populações foram conduzidos com o propósito de revelar se um fenômeno humano em particular possui uma influência genética substancial, e genes que influenciam no risco para transtornos neuropsiquiátricos foram identificados nas últimas décadas.

Estudos de genética realizados com famílias, gêmeos e adotados indicaram a existência de um componente genético no TB, SZ e TDM (CRADDOCK; SKLAR, 2013; KENDLER; GRUENBERG; KINNEY, 1994; MCGUFFIN et al., 1996; NURNBERGER; BERRETTINI; NICULESCU, 2016) e concluíram que a herdabilidade estimada – i.e. a contribuição herdada de variância genética para a variância de traços – varia entre os diferentes transtornos (HEBE BRAND et al., 2010). A Tabela 1 traz as herdabilidades estimadas para TB, SZ e TDM.

Tabela 1. Herdabilidade estimada do Transtorno Bipolar, Esquizofrenia e Transtorno Depressivo Maior em estudos de famílias e de gêmeos

Transtorno	Herdabilidade estimada (%)	Referência
Transtorno Bipolar	60 – 85	(SMOLLER; FINN, 2003)
Esquizofrenia	73 – 90	(SULLIVAN; KENDLER; NEALE, 2003)
Transtorno Depressivo Maior	31 – 42	(SULLIVAN; NEALE; KENDLER, 2000)

Fonte: Elaborada pela autora.

Atualmente, sabe-se que o risco de desenvolver um transtorno mental eleva-se se um familiar possuir a doença, ou mesmo outro transtorno psiquiátrico, sugerindo um forte componente hereditário nessas condições (CHOU et al., 2017; HYMAN, 2000). O risco genético consiste na probabilidade de um indivíduo desenvolver uma doença em função dos marcadores genéticos que foram herdados. Desta forma, o risco genético para a doença é menor em um indivíduo da população em geral sem histórico familiar do transtorno psiquiátrico

comparado a um indivíduo que possui um parente - principalmente de primeiro grau – com o transtorno.

Um estudo realizado pelo *Brainstorm Consortium* utilizando dados de GWAS provenientes de milhares de indivíduos revelou que variantes comuns de risco para transtornos psiquiátricos se correlacionam significativamente, principalmente entre SZ, TB, TDM e transtorno de déficit de atenção com hiperatividade (TDAH) (BRAINSTORM CONSORTIUM et al., 2018). Neste trabalho os autores observaram que, entre os transtornos psiquiátricos, SZ apresentou uma correlação genética significativa com a maioria dos demais transtornos, enquanto o TDM foi positivamente correlacionado – embora não necessariamente de forma significativa - com as demais doenças testadas. Além disso, foi constatado um alto grau de correlação entre SZ, TB, TDM, TDAH e transtornos de ansiedade (TA), como pode ser conferido na Figura 4 (BRAINSTORM CONSORTIUM et al., 2018). Outros GWAS também indicam que variantes individuais de risco comum podem se sobrepor além de limites diagnósticos tradicionais (INTERNATIONAL SCHIZOPHRENIA CONSORTIUM et al., 2009) e que SZ, TB e TDM podem apresentar correlações genéticas (CROSS-DISORDER GROUP OF THE PSYCHIATRIC GENOMICS CONSORTIUM et al., 2013). Assim, este grau de correlação genética entre certos transtornos mentais evidencia que suas atuais delimitações clínicas podem não refletir processos fisiopatológicos essencialmente distintos (ao menos em nível genético). Com isso, nota-se mais um indício da importância da condução de estudos em psiquiatria adotando-se uma abordagem transdiagnóstica.

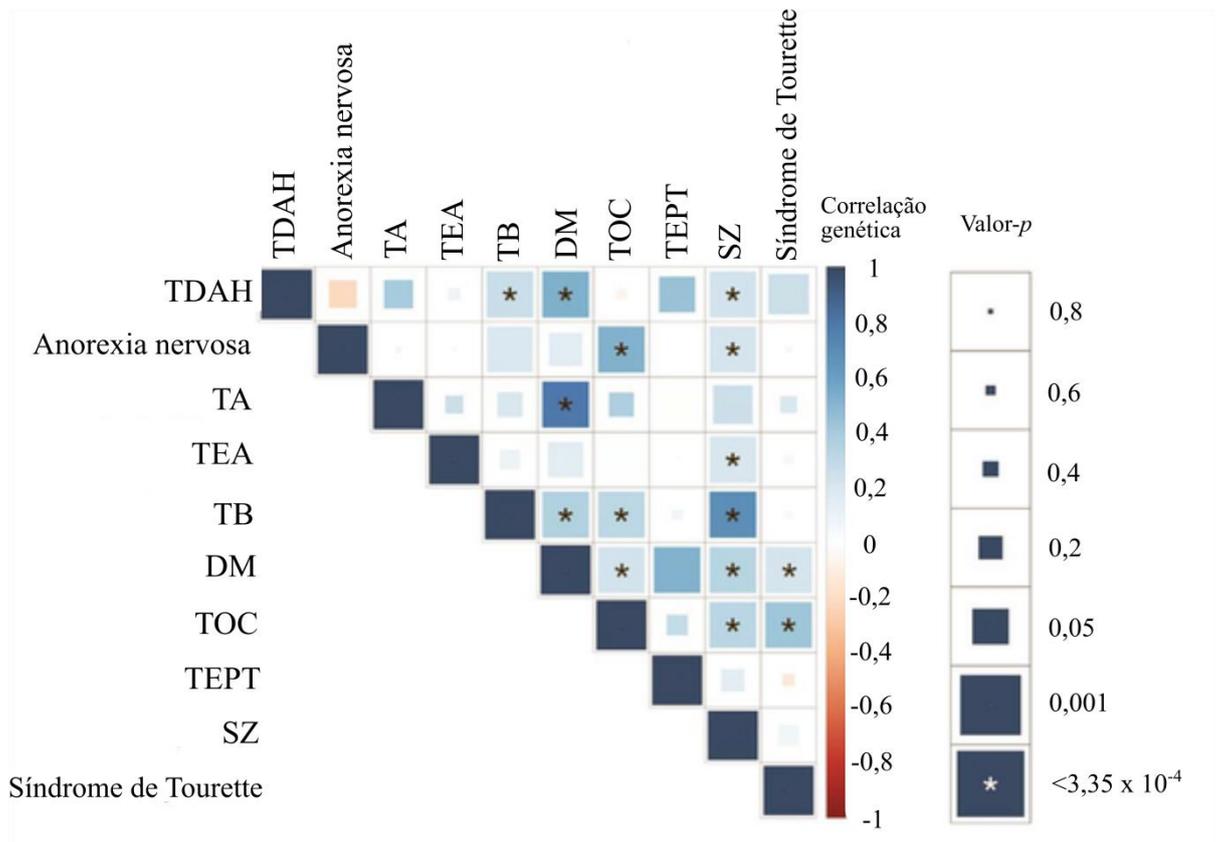


Figura 4. Correlações genéticas entre transtornos psiquiátricos. A cor de cada quadrado indica a magnitude da correlação e o tamanho do quadrado indica a significância. Correlações significativas são representadas por quadrados completamente preenchidos. Os asteriscos indicam correlações genéticas que foram significativamente diferentes de zero após correção de Bonferroni. TDM, Transtorno Depressivo Maior; TA, Transtornos de Ansiedade; TB, Transtorno Bipolar; TDAH, Transtorno de Déficit de Atenção com Hiperatividade; TEA, Transtornos do Espectro Autista; TEPT, Transtorno de Estresse Pós-Traumático; TOC, Transtorno Obsessivo Compulsivo, SZ, Esquizofrenia. Adaptado de Brainstorm Consortium *et al.*, 2018.

Adicionalmente, não há uma relação simples e direta entre um gene e determinado transtorno mental. Genes únicos ou mutações genéticas pontuais não explicam por si só a ocorrência dos transtornos psiquiátricos; estudos apontam que o desenvolvimento de um transtorno específico é o resultado da interação complexa entre distintos genes de suscetibilidade e diversos fatores ambientais (como exposição a eventos traumáticos, agentes infecciosos e estresse) (HEBE BRAND *et al.*, 2010; KENDLER, 2005). Além disso, muitos genes de suscetibilidade até então propostos para esses transtornos não têm apresentado

replicação consistente, mostrando efeitos estatisticamente significativos em alguns estudos, mas não em outros. Até certo ponto, isto pode ser o reflexo da dificuldade de se mensurar pequenos tamanhos de efeito, os quais geralmente necessitam milhares de indivíduos para se atingir significância (NURNBERGER; BERRETTINI; NICULESCU, 2016).

Tendo em vista os dados supracitados e o fato de que há diversos *loci* gênicos e mecanismos biológicos complexos os quais interagem com fatores não-genéticos (ambientais), entender como múltiplos genes, na interação gene-ambiente, influenciam o funcionamento cerebral e o comportamento é fundamental para que avanços no desenvolvimento de novos tratamentos sejam concretizados. Para isso, torna-se imprescindível explorar vias moleculares como um todo em vez de um gene individual ou de vários genes com baixo efeito estatístico. Neste sentido, nos últimos anos surgiram estratégias – fundamentadas na biologia de sistemas - que hoje permitem uma investigação mais aprofundada sobre o efeito dos componentes genéticos na fisiopatologia de doenças humanas complexas, como os transtornos psiquiátricos.

1.6 BIOLOGIA DE SISTEMAS

Para entendermos a biologia em um nível sistêmico, faz-se necessária a análise estrutural e dinâmica da função celular e do organismo em detrimento de características de partes isoladas de uma célula ou de um organismo (KITANO, 2002). A biologia de sistemas deriva da teoria de sistemas, por meio da qual se entende que os elementos individuais são menos importantes na determinação do comportamento de um sistema, quando comparado às interações estabelecidas entre eles. Desta forma, a biologia de sistemas engloba a definição e a análise das interações entre todos os elementos que compõem um sistema operante, com o objetivo principal de compreender como este sistema funciona (MESAROVIC; SREENATH; KEENE, 2004).

Distintos níveis hierárquicos de organização e funcionalidade biológicos estão presentes em um sistema biológico quando este é estudado sob a ótica da biologia de sistemas. Esses

níveis hierárquicos exercem influência sobre o sistema, o que leva os componentes individuais a atuarem de forma cooperativa, para que possam atingir estados estáveis de homeostase (NIJHOUT; BEST; REED, 2019).

Sabemos que o armazenamento e o processamento de informação, bem como a execução de diversos programas celulares são sustentados por diferentes níveis de organização, conhecidos como genoma, transcriptoma, proteoma e metaboloma. No entanto, a distinção entre esses níveis organizacionais se torna complexa, pois apesar da informação de longa duração ser armazenada no genoma, o proteoma é essencial para o armazenamento de curta duração e a coleta de informações controlada por fatores de transcrição é influenciada fortemente pelo estado no qual se encontra o metaboloma (OLTVAI; BARABÁSI, 2002). Com este cenário, considerando a integração desses níveis organizacionais distintos, podemos destacar funções celulares distribuídas entre grupos de componentes heterogêneos interagindo dentro de grandes redes. As estruturas que compõem estas redes são regidas por princípios similares e, desta forma, uma pirâmide de complexidade simples formada por vários componentes moleculares da célula – genes, RNAs, proteínas e metabólitos – pode exemplificar esta organização biológica dinâmica e sistêmica (Figura 5) (OLTVAI; BARABÁSI, 2002).

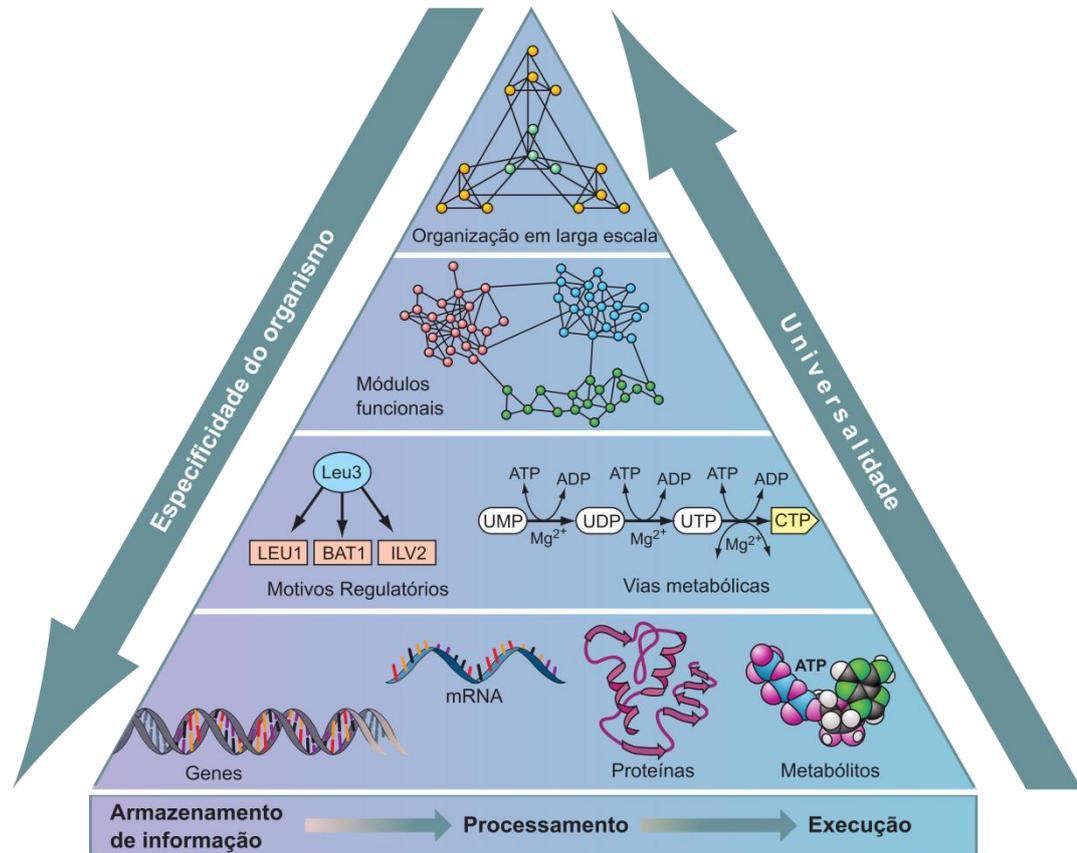


Figura 5. Pirâmide de complexidade biológica: do particular ao universal. A base da pirâmide mostra a representação tradicional da organização funcional da célula: genoma, transcriptoma, proteoma e metaboloma (nível 1). Há uma integração notável de várias camadas em nível regulatório e estrutural. Visões sobre a lógica da organização celular podem ser alcançadas quando observamos a célula como uma rede complexa na qual os componentes estão conectados por conexões funcionais. No nível mais baixo esses componentes formam motivos regulatórios ou vias metabólicas (nível 2), os quais são os blocos de construção dos módulos funcionais (nível 3). Estes módulos são agrupados, gerando uma arquitetura hierárquica de organização em larga escala (nível 4). Adaptado de Oltvai e Barabási, 2002.

Sendo assim, o entendimento das interações complexas inerentes aos sistemas biológicos surge como uma questão central e poderá ter um forte impacto no futuro da medicina. A biologia de sistemas pode trazer respostas a questões até então não esclarecidas em sua completude, principalmente pelo fato de muitas vezes ter sido adotada uma abordagem determinística para explicar questões complexas, nas quais partes individuais sozinhas (um

gene, por exemplo) são insuficientes para que possamos decifrar a complexidade que subjaz um sistema biológico, ou até mesmo um comportamento.

Neste sentido, para a compreensão dos reflexos das perturbações em um sistema biológico, que muitas vezes levam ao aparecimento de alterações fenotípicas em um organismo, faz-se necessário estudar os diversos níveis de complexidade biológica. Desta forma, o crescente uso de tecnologias de alto rendimento (*high throughput*) nos últimos anos permitiu a obtenção de uma grande quantidade de informações, as quais uma vez exploradas por meio de abordagens ômicas fornecem uma perspectiva molecular mais holística dos sistemas biológicos quando comparadas a metodologias tradicionais. Tais abordagens ômicas englobam os distintos níveis moleculares, compreendendo genômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica (EUCEDA; GISKEØDEGÅRD; BATHEN, 2015), conforme pode ser visto na Figura 6.

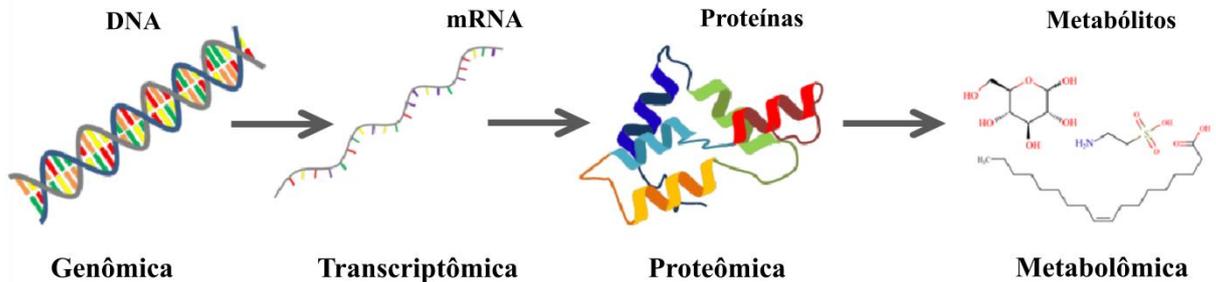


Figura 6. Cascata ômica. Representação dos distintos níveis moleculares em um organismo. As setas correspondem a processos biológicos por meio dos quais a informação é transferida de um nível para outro. Adaptado de Euceda *et al.*, 2015.

Com o objetivo de compreender melhor os mecanismos biológicos potencialmente envolvidos na fisiopatologia do TB, SZ e TDM sob uma perspectiva sistêmica, nesta tese foram utilizados dados de transcriptômica. O transcriptoma compreende o universo das moléculas de RNA mensageiro de uma célula, tecido, ou organismo de interesse (VAILATI-RIBONI; PALOMBO; LOOR, 2017). Esses dados podem ser obtidos a partir da tecnologia de microarranjo ou com o uso de sequenciamento de RNA (RNA-Seq). A maioria dos bancos de

dados de transcriptômica disponíveis em repositórios *online* ainda é de microrranjo, pois este foi um dos métodos pioneiros na geração deste tipo de informações; no entanto, a tecnologia de RNA-Seq vem ganhando cada vez mais espaço, pois possui maior resolução e acurácia, viabiliza o estudo de sequências não-codificantes e facilita a identificação de eventos de edição transcricional, além de não ser necessário conhecer previamente a sequência do transcrito (MANZONI et al., 2018; WANG; GERSTEIN; SNYDER, 2009). Análises que utilizam dados de transcriptômica são importantes na identificação de vias e de processos biológicos ativos ou que sofreram algum tipo de modificação (decorrente de alguma condição patológica, por exemplo). Entretanto, é válido destacar que nem sempre a informação transcricional se corresponderá com os níveis proteicos; portanto, é preciso ter prudência ao se interpretar e formular estratégias experimentais a partir dessa categoria de dados.

1.6.1 Redes regulatórias transcricionais

As redes regulatórias transcricionais (TRNs) - baseadas em dados de transcriptômica - possuem papel fundamental em todo processo biológico, como ciclo celular, diferenciação celular, transdução de sinal e metabolismo. A compreensão da dinâmica dessas redes pode auxiliar na elucidação dos mecanismos relacionados a doenças, as quais podem ser o resultado de processos celulares alterados (KARLEBACH; SHAMIR, 2008).

Essas TRNs podem ser construídas por meio de inferência, com o uso de engenharia reversa, processo por meio do qual são identificadas interações gênicas a partir de dados experimentais de expressão gênica e com o auxílio de métodos computacionais (algoritmos) (BANSAL et al., 2007; LIU, 2015). A construção dessas TRNs tem sido utilizada para compreender com maior profundidade a natureza da regulação gênica. A Figura 7 traz uma representação da construção de uma rede regulatória utilizando engenharia reversa (LIU, 2015).

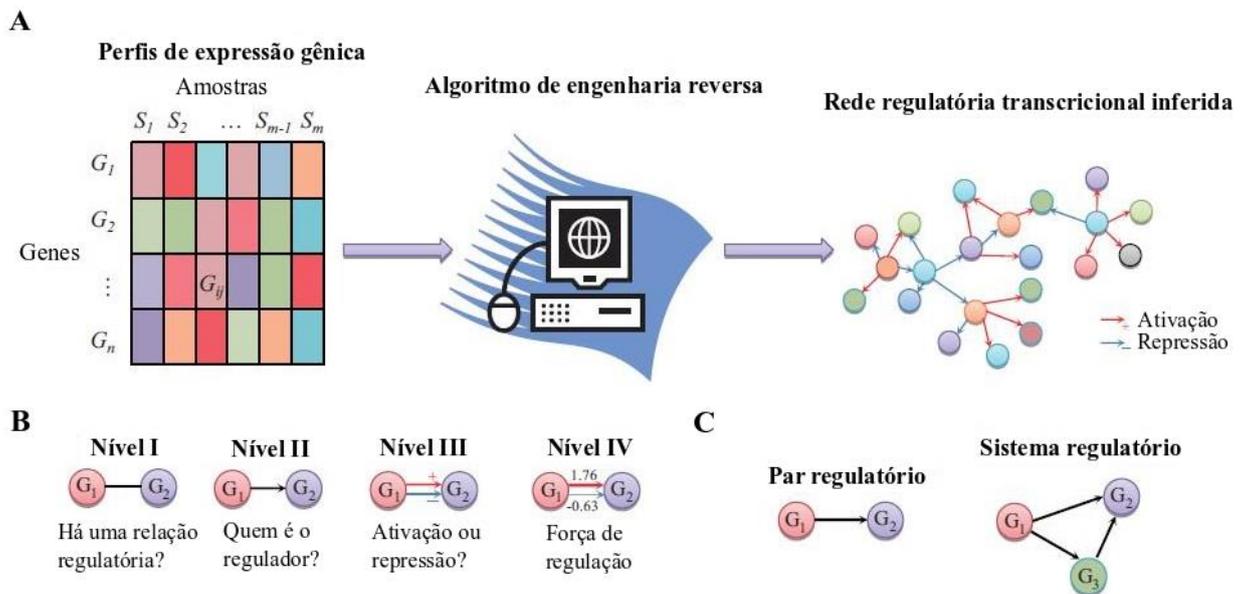


Figura 7. Representação geral de engenharia reversa de redes regulatórias transcricionais. (A) Modelo de inferência de rede regulatória a partir de perfis de expressão gênica. Existem vários tipos de dados de expressão gênica, tais como dados de condição-específica, perturbação e séries cronológicas. Um algoritmo de engenharia reversa recebe dados de entrada relativos a perfis de expressão gênica e emite as relações regulatórias inferidas entre os genes na forma de uma rede. (B) Os quatro níveis inter-relacionados de informação de parâmetros regulatórios devem ser determinados na engenharia reversa. O algoritmo aborda as questões de regulação gênica em um ou vários níveis combinados. (C) O par e o sistema regulatórios na modelagem: A tomada de decisão da relação regulatória de um par individual é em uma forma isolada. No entanto, o sistema regulatório consiste em regulações complexas de combinação e cooperação, tais como a regulação indireta a partir do gene G_1 para o gene G_2 condicionada pelo gene G_3 , o qual necessita ser modelado em um modo sistemático. Adaptado de Liu, 2015.

Métodos computacionais distintos têm sido desenvolvidos para realizar a inferência de redes regulatórias gênicas, nas quais os vértices representam os genes e as interações de regulação direta entre eles são representadas por arestas que conectam os vértices (Figura 8) (KARLEBACH; SHAMIR, 2008; MARGOLIN et al., 2006a, 2006b). Um desses métodos é o algoritmo para a reconstrução de redes celulares acuradas (ARACNE), o qual permite identificar interações transcricionais entre produtos gênicos através da utilização do perfil de dados de expressão gênica por microarranjo. O ARACNE, de forma similar a outros algoritmos,

prediz associações funcionais em potencial entre os genes, ou novas funções para genes que ainda não estão caracterizados, por meio da identificação de dependências estatísticas entre produtos gênicos (MARGOLIN et al., 2006b).

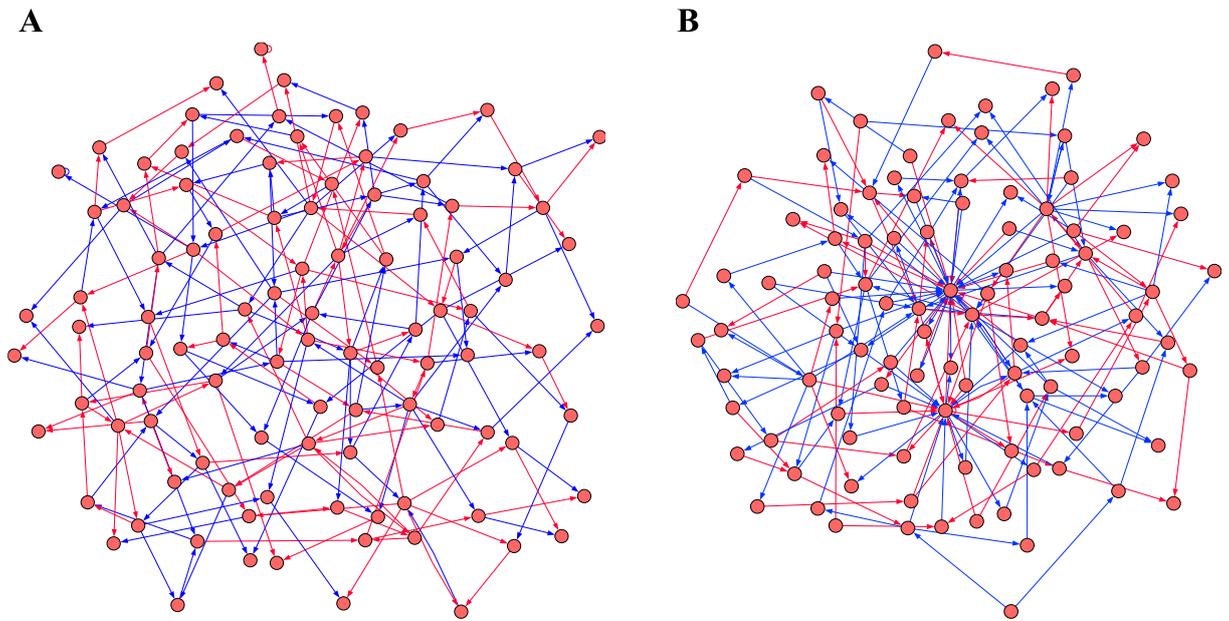


Figura 8. Topologia de redes regulatórias gênicas. Cada vértice vermelho representa um gene. As aristas azuis e vermelhas correspondem, respectivamente, a interações de ativação e de inibição entre os genes. (A) Cada gene tem a mesma probabilidade de se conectar com qualquer um dos demais genes da rede. (B) Rede formada por conexões desiguais entre os genes, caracterizada por núcleos centrais de interação, com alguns genes apresentando muitas conexões. Adaptado de Margolin *et al.*, 2006a.

1.6.2 Análise de reguladores mestres

Uma das abordagens utilizadas para a análise de redes regulatórias centra-se em fatores de transcrição (TFs). Os TFs atuam como moléculas essenciais no controle da expressão gênica e, conseqüentemente, no funcionamento celular. Sob o comando dos TFs, cada gene influencia a atividade celular através da geração de RNAm que guia a síntese de proteínas pelos ribossomos no citoplasma, um compartimento celular onde eventos moleculares e reações bioquímicas acontecem (LEE; TZOU, 2009). Nos eucariotos, algumas das proteínas geradas

são elas mesmas TFs que voltam para o núcleo para controlar a expressão de um ou de muitos genes. Esse mecanismo complexo de controle da expressão gênica por TFs pode ser representado como uma rede de regulação gênica, a qual pode ser usada para descrever o comportamento fenotípico de um sistema em estudo, como uma doença (LEE; TZOU, 2009).

Neste contexto de redes gênicas, certos TFs atuam como ‘reguladores mestres’ (MRs) coordenando o comportamento celular e influenciando determinado fenótipo. Nas redes regulatórias centradas em TFs, cada TF da rede é conectado a um conjunto de genes que ele regula de forma direta - o que constitui uma unidade regulatória (regulon) (BASSO et al., 2005). Nestas redes, os MRs podem ser identificados com o uso da análise de reguladores mestres (MRA), que consiste na análise da estrutura de uma TRN que contém TFs e seus alvos, juntamente com informações referentes aos valores de expressão diferencial, o que permite a identificação dos TFs cujos alvos estão enriquecidos em uma assinatura gênica em particular (e.g. em uma lista de genes diferencialmente expressos provenientes de um fenótipo específico, como em uma doença) (BASSO et al., 2005).

O enriquecimento pode ser avaliado usando a análise de enriquecimento de um conjunto de genes (GSEA), a qual consiste em um método computacional que determina se, dado um conjunto de genes S (e.g. genes que participam da mesma via bioquímica) definido *a priori*, os componentes de S estão distribuídos randomicamente em uma lista L de ranking dos genes ou se se encontram preferencialmente na base ou no topo de L ; ou seja, mostra se existem diferenças concordantes e estatisticamente significativas entre dois estados biológicos (e.g. caso e controle) (SUBRAMANIAN et al., 2005). Assim, GSEA pode ser usada para avaliar se determinado regulon está enriquecido para genes que se encontram diferencialmente expressos entre duas classes de dados de expressão gênica, verificando a correlação entre a unidade regulatória e um fenótipo específico (e.g. uma doença).

Desta forma, o objetivo da MRA é colocar o conjunto de genes pertencente à assinatura de determinado fenótipo dentro de um contexto regulatório e identificar os MRs responsáveis por coordenar a atividade desses genes, destacando assim o aparato regulatório que está conduzindo a uma diferenciação fenotípica (BASSO et al., 2005; LEFEBVRE et al., 2010). Em suma, as TRNs são constituídas relativamente por um pequeno número de nodos – que correspondem aos MRs – os quais apresentam alto grau de conectividade e coletivamente compõem o aparato gênico responsável por orquestrar o programa regulatório de diferenciação fenotípica.

A busca de MRs como biomarcadores moleculares de doenças tem crescido nos últimos anos, uma vez que esses podem representar assinaturas gênicas que explicam o envolvimento de vias biológicas e não apenas um gene individual em uma patologia. Como reflexo, o uso desse tipo de abordagem gerou achados interessantes em distintas áreas da pesquisa biomédica, como na imunologia (LEFEBVRE et al., 2010), na diabetes tipo 2 (PIAO et al., 2012), no câncer (CARRO et al., 2010; CASTRO et al., 2016; FLETCHER et al., 2013), e mais recentemente na psiquiatria (PFAFFENSELLER et al., 2016; TORSHIZI et al., 2019). Em um estudo realizado por nosso grupo, resultados inovadores foram encontrados utilizando como abordagem a busca por MRs no TB, tendo como principal achado o TF *Early Growth Response* (EGR) 3 atuando como um MR e estando reprimido no CPF de pacientes bipolares (PFAFFENSELLER et al., 2016).

O EGR3 pertence à família de genes de ativação imediata (IEGs), os quais são fatores de transcrição ativados no cérebro em resposta a estímulos ambientais, como o estresse (MARBALLI; GALLITANO, 2018). Genes que apresentam o potencial de traduzir estímulos ambientais em alterações no cérebro em longo prazo, como é o caso de genes da família dos IEGs e de genes relacionados ao ritmo circadiano (como os da família dos criptocromos, por exemplo), representam alvos interessantes de estudo, uma vez que podem influenciar no risco

para transtornos psiquiátricos. Por se tratar de um fator de transcrição central, o EGR3 regula uma série de genes-alvo que atuam em processos neurobiológicos críticos, tais como plasticidade sináptica, memória e cognição – processos estes que estão alterados nos transtornos mentais. Adicionalmente, tendo em vista que a expressão do EGR3 pode ser induzida pelo BDNF, níveis reduzidos desta neurotrofina encontrados nesses transtornos podem explicar, ao menos parcialmente, a repressão do EGR3 identificada no TB (PFAFFENSELLER et al., 2018). Estes achados abrem novas perspectivas de estudo deste potencial alvo - bem como de genes e vias relacionados – no que diz respeito à fisiopatologia do TB, SZ e TDM.

1.6.3 Análise de enriquecimento funcional

Como mencionado anteriormente, experimentos envolvendo novas tecnologias na era pós-genômica geram uma grande quantidade de informação. Com isso, além de identificar os genes ou regulons-chave em certo fenótipo, torna-se imprescindível destacar e interpretar as funções desses produtos gênicos em nível sistêmico. Neste sentido, uma etapa comum que pode ser conduzida em investigações *downstream* a partir de dados de experimentos de alto rendimento é a análise de enriquecimento funcional de um conjunto de genes (HUANG; SHERMAN; LEMPICKI, 2009). Esta tem como objetivo investigar associações funcionais entre uma lista de genes de interesse (obtidos como resultado de um experimento) e conjuntos específicos de genes de referência anotados com funções em comum (já conhecidas e documentadas em bases de dados) (SUN et al., 2018).

Desta maneira, os genes - constatados a partir de experimentos biológicos - que possuem maior importância em uma condição (também conhecidos como genes ativos) são comumente representados pelas funções nas quais estão envolvidos - tais como aquelas relacionadas a componentes celulares, processos biológicos, vias de sinalização e funções moleculares (REIMAND et al., 2019; SUN et al., 2018). Um panorama sistemático dessas funções é derivado de bases de dados de anotação, como Gene Ontology (GO) (ASHBURNER et al.,

2000; HARRIS et al., 2004), KEGG (KANEHISA; GOTO, 2000) e MSigDB (LIBERZON et al., 2015).

Um processo biológico é tipicamente constituído por um grupo de genes e a fundamentação principal da análise de enriquecimento funcional é baseada no fato de que se um processo biológico tem um funcionamento anormal em determinado fenótipo, os genes coatuantes neste processo deverão ter um maior potencial de serem selecionados como um grupo relevante com o uso de tecnologias de varredura de alto rendimento (HUANG; SHERMAN; LEMPICKI, 2009). Assim, as extensas listas de genes que se encontram alterados em uma patologia (e.g. com expressão aumentada ou diminuída em relação a um grupo controle) passam a serem vistas como grupos relevantes de genes que estão associados a vias e funções biológicas, e não mais como inúmeros genes alterados analisados individualmente. Essa visão analítica aumenta a probabilidade de identificar corretamente os processos biológicos pertinentes a um fenômeno biológico em estudo, como é o caso de uma doença.

As bases de dados que são usadas na anotação de funções, como GO, mapeiam sistematicamente muitos genes associados a termos de anotação biológica (e.g. termos GO ou vias), e então examinam estatisticamente o enriquecimento de genes para cada um dos termos de anotação, por meio da comparação com um controle (ou referência). Isso permite que os termos de anotação com genes enriquecidos possam ser identificados com elevado desempenho a partir de milhares de termos de anotação (CURTIS; ORESIC; VIDAL-PUIG, 2005; KHATRI; DRĂGHICI, 2005). Esses termos enriquecidos, os quais por vezes representam vias biológicas, resultam em novas e importantes perspectivas que podem possibilitar uma melhor compreensão dos processos biológicos subjacentes a imensas listas de genes resultantes de experimentos como microarranjo e RNA-Seq.

1.7 JUSTIFICATIVA

Os transtornos psiquiátricos representam um importante problema de saúde pública no mundo todo e, apesar da grande quantidade de pesquisas científicas objetivando o esclarecimento de suas fisiopatologias, até o momento não existem marcadores biológicos específicos para TB, SZ ou TDM. Esses transtornos têm etiologia complexa e multifatorial e compartilham fatores genéticos e ambientais, o que explica em parte a dificuldade de serem encontrados biomarcadores que caracterizem cada uma desses transtornos individualmente. As similaridades entre os transtornos mentais podem refletir a promiscuidade de biomarcadores relatada entre eles e chama a atenção para o fato de que podem ser mais bem compreendidos se uma dimensão única, a de psicopatologia geral, for adotada. Neste sentido, estudar os transtornos utilizando uma abordagem transdiagnóstica, não os limitando de acordo com as categorias presentes no DSM, pode trazer avanços no que diz respeito ao entendimento geral dessas doenças.

Atualmente ao se realizar a busca por potenciais biomarcadores de determinadas doenças ou condições, ou até mesmo quando se pretende utilizar esses marcadores com a intenção de diferenciar dois ou mais transtornos, pode-se fazer uso de técnicas computacionais capazes de identificar padrões de interação entre uma série de variáveis para analisar dados complexos (*machine learning*). A utilização de abordagens desta natureza tem muito a acrescentar para o campo de estudo dos transtornos psiquiátricos, visto que não raramente trabalhamos com uma grande quantidade de variáveis, tanto clínicas como biológicas.

Desta maneira, faz-se necessária a utilização de novas perspectivas que incorporem a complexidade desses transtornos multissistêmicos, considerando que estratégias clássicas de investigação não têm sido efetivas em clarificar determinadas questões, como as relativas aos mecanismos fisiopatológicos. A aplicação de metodologias que possuem características intrínsecas para explorar sistemas complexos - como é o caso de abordagens que se valem da

biologia de sistemas e tecnologias como a transcriptômica aliadas a métodos computacionais - pode enriquecer a pesquisa na área de saúde mental. Além disso, o uso de técnicas de *machine learning*, por exemplo, pode ser usado para explorar uma grande quantidade de variáveis as quais podem se mostrar úteis na distinção entre transtornos psiquiátricos que possuem características em comum.

Particularmente, a busca por reguladores mestres tem potencial de acrescentar substancialmente na compreensão de uma condição ou doença, pois podem representar assinaturas gênicas que refletem a implicação de vias biológicas em uma patologia, ao invés de destacar o papel de somente um ou alguns genes individuais. Desta forma, encontrar esses MRs como biomarcadores relacionados a transtornos psiquiátricos pode significar a identificação de novos alvos em potencial e até mesmo propiciar inovação no desenvolvimento de esquemas terapêuticos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar biomarcadores periféricos que sejam capazes de diferenciar transtornos psiquiátricos com características clínicas semelhantes (como é o caso da depressão bipolar e da depressão unipolar), além de estudar a regulação transcricional nos transtornos psiquiátricos (TB, SZ e TDM) através da identificação de reguladores mestres e sua implicação na fisiopatologia desses transtornos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar o potencial uso prognóstico de biomarcadores periféricos de maneira transdiagnóstica;
- b) Verificar a possibilidade de utilização de biomarcadores séricos para diferenciar transtornos psiquiátricos com características clínicas semelhantes (como é o caso da depressão bipolar e da depressão unipolar), por meio de técnicas de *machine learning*;

- c) Identificar, através do uso de ferramentas de bioinformática, fatores de transcrição que atuem como potenciais reguladores mestres no TB, SZ e TDM, baseado em redes de unidades regulatórias no CPF dorsolateral;
- d) Investigar o estado de ativação ou repressão dos potenciais reguladores mestres, assim como os processos biológicos envolvidos em cada transtorno, a fim de caracterizar os fenótipos transcricionais de cada diagnóstico;
- e) Comparar, através de uma abordagem transdiagnóstica, a expressão gênica de marcadores biológicos relevantes na interação gene-ambiente em sangue total de controles e pacientes com TB, SZ e TDM;
- f) Associar possíveis alterações na expressão gênica destes marcadores biológicos relevantes na interação gene-ambiente nos pacientes psiquiátricos com características clínicas associadas à progressão dos transtornos.

PARTE II

Artigos científicos

3 ARTIGOS CIENTÍFICOS

3.1 CAPÍTULO 1

Decoding rumination: A machine learning approach to a transdiagnostic sample of outpatients with anxiety, mood and psychotic disorders.

Érico de Moura Silveira Júnior, Ives Cavalcante Passos, Jan Scott, **Giovana Bristot**,
Ellen Scotton, Lorena Sena Teixeira Mendes, Ana Claudia Umpierre Knackfuss,
Luciana Gerchmann, Adam Fijtman, Andrea Ruschel Trasel, Giovanni Abrahão Salum,
Márcia Kauer-Sant'Anna

Artigo publicado em 2020 no periódico *Journal of Psychiatric Research*.

Fator de impacto (IF): 4,791

3.2 CAPÍTULO 2

Differential biomarker signatures in unipolar and bipolar depression: a machine learning approach.

Bianca Wollenhaupt-Aguiar, Diego Librenza-Garcia, **Giovana Bristot**, Laura Przybylski, Laura Stertz, Renan Kubiachi Burque, Keila Mendes Ceresér, Lucas Spanemberg, Marco Antônio Caldieraro, Benicio N Frey, Marcelo P Fleck, **Márcia Kauer-Sant'Anna**, Ives Cavalcante Passos, Flávio Kapczinski

Artigo publicado em 2020 no periódico *Australian and New Zealand Journal of Psychiatry*.

Fator de impacto (IF): 5,744

3.3 CAPÍTULO 3

*Gene Regulatory Network of Dorsolateral Prefrontal Cortex: A Master Regulator
Analysis of Major Psychiatric Disorders*

Giovana Bristot, Marco Antônio De Bastiani, Bianca Pfaffenseller, Flávio Kapczinski,

Márcia Kauer-Sant'Anna

Artigo publicado no periódico *Molecular Neurobiology* em 2020.

Fator de impacto (IF): 5,590

3.4 CAPÍTULO 4

*Early growth response 1 (EGR1) is downregulated in peripheral blood from patients
with major psychiatric disorders*

Giovana Bristot, Jacson Feiten, Bianca Pfaffenseller, Gabriel Henrique Hizo, Gabriela Maria Pereira Possebon, Fernanda Endler Valiati, Jairo Vinicius Pinto, Marco Antônio Caldieraro, Marcelo Pio de Almeida Fleck, Clarissa Severino Gama, **Márcia Kauer-Sant'Anna**

Artigo submetido para publicação no periódico *Journal of Psychiatric Research* em 2022.

Fator de impacto (IF): 4,791

PARTE III

Discussão e Conclusão

4. DISCUSSÃO

A fisiopatologia dos transtornos psiquiátricos é complexa e heterogênea, envolvendo uma série de fatores genéticos, comportamentais e ambientais. Cada transtorno possui aspectos clínicos particulares que frequentemente o definem, porém, transtornos como TB, TDM e SZ, os quais representam o foco central desta tese, também exibem uma certa sobreposição nas suas manifestações fenotípicas, em especial quando nos atemos à comparação de transtornos com similaridades nos sintomas, fatores de risco associados e terapias medicamentosas. Assim, abordagens que integram níveis de informação variados, de modo a englobar fatores genéticos, ambientais, circuitos comportamentais e sintomas auto reportados, podem possibilitar uma melhor compreensão relacionada à natureza de saúde e doença mental em graus variados de disfunção em sistemas psicobiológicos.

Nesse contexto, no artigo que constitui o capítulo I desta tese foram utilizadas técnicas de *machine learning* para analisar padrões de ruminação através de uma perspectiva RDoC. A ruminação é caracterizada pelo pensamento auto focado e repetitivo, que não está necessariamente centrado na resolução dos problemas que inicialmente deram origem ao fenômeno (NOLEN-HOEKSEMA; WISCO; LYUBOMIRSKY, 2008), o qual é classificado como mal adaptativo, também chamado de *brooding*. Ademais, este estudo também teve como objetivo determinar variáveis clínicas (sintomas psiquiátricos, histórico de suicídio e hospitalizações, funcionalidade, uso de medicações e comorbidades), sociodemográficas, e biológicas (marcadores inflamatórios: IL-6, IL-1 β , IL-10, TNF- α , CCL11; e BDNF) que poderiam prever níveis maiores de ruminação mal adaptativa em uma amostra transdiagnóstica, composta por pacientes ambulatoriais com diagnóstico de Transtorno Esquizoafetivo, SZ, TB, TDM, TA, TOC e Transtorno de Estresse Pós-Traumático (TEPT).

Como principais resultados, observamos que as variáveis preditoras mais relevantes para distinguir indivíduos mais ruminadores dos menos ruminadores foram: *Penn States Worry*

Questionnaire (PSWQ), Escala de Transtorno de Ansiedade Generalizada 7 (GAD-7), Escala de impressão clínica global (CGI-S), Escala de avaliação de Depressão de Hamilton (HDRS), severidade da doença, status socioeconômico, e diagnóstico atual de Transtorno de Pânico. Desta forma, não foram encontradas associações significativas entre níveis de biomarcadores e ruminação, apesar de estar bem documentado que situações de estresse modificam os níveis de marcadores inflamatórios e BDNF (importante para a plasticidade sináptica e para o funcionamento ideal do CPF e do hipocampo, por exemplo) (CASTRÉN, 2014; GOUIN et al., 2012; MARSLAND et al., 2017). Isso pode ser explicado pelo fato de os pacientes (tanto os mais quanto os menos ruminadores) estarem em uso de medicações para o tratamento dos transtornos, e sabe-se que muitos dos medicamentos psiquiátricos modulam os níveis desses marcadores biológicos séricos (CAPUZZI et al., 2017; LIN; HUANG, 2020; NASSAR; AZAB, 2014; WANG et al., 2019).

Essa busca por moléculas que podem ser mensuradas periféricamente, como é o caso de biomarcadores séricos, tem sido frequente nos últimos anos no que se refere a transtornos psiquiátricos. O intuito desse interesse reside no fato de que esses marcadores possam ser úteis na distinção entre diagnósticos psiquiátricos com características clínicas correlatas, como é o caso, por exemplo, da depressão bipolar e da depressão unipolar, o que representa uma questão ainda desafiadora na prática clínica, devido à similaridade desses episódios depressivos em termos clínicos. Neste sentido, o capítulo II teve como objetivo encontrar assinaturas que pudessem auxiliar a diferenciar pacientes com depressão bipolar de pacientes com depressão unipolar, além de distingui-los de controles saudáveis. Para isso, novamente utilizamos abordagens de *machine learning* juntamente com medidas de biomarcadores inflamatórios (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ , IL-17A), de estresse oxidativo (TBARS e carbonil) e BDNF, obtendo resultados sugestivos de que algoritmos de *machine learning* podem auxiliar

na discriminação entre depressão bipolar, depressão unipolar e controles saudáveis utilizando medidas de determinados biomarcadores periféricos.

Assim, dentre os marcadores biológicos acessados, os que demonstraram ser as variáveis preditoras mais relevantes para diferenciar pacientes com depressão bipolar daqueles com depressão unipolar foram IL-4, TBARS e IL-10; ao passo que IL-6, IL-4, TBARS, carbonil e IL17-A foram as de maior relevância para a distinção entre pacientes com depressão bipolar e controles. Por fim, IL-6, carbonil, BDNF, IL-10, IL17-A, IL-4 e TNF- α demonstraram a melhor performance como variáveis capazes de predizer a separação entre pacientes unipolares e controles saudáveis. Desta maneira, os achados presentes neste capítulo apontam que modelos de *machine learning* utilizando como variáveis medidas de biomarcadores periféricos tem potencial de serem utilizados como auxiliares na prática clínica. No entanto, para isso é necessário que outros estudos independentes e com maior número de indivíduos reproduzam os achados deste trabalho.

Até este momento, do ponto de vista biológico, investigamos o papel de potenciais biomarcadores que podem ser encontrados na periferia, e que, portanto, apresentam maior facilidade de acesso e mensuração. Não obstante, como estamos estudando doenças psiquiátricas, a base das alterações que originam essas condições envolve o SNC, seja pelo fato de questões genéticas/hereditárias alterarem o funcionamento normal de certas estruturas cerebrais (DEMLOW; WOLAŃCZYK, 2017; HOEHE; MORRIS-ROSENDAHL, 2018) ou ainda fatores ambientais, tais como eventos traumáticos, estressores de natureza diversa e alterações no ritmo biológico, que podem impactar em nível central a ponto de causar mudanças estruturais e funcionais no encéfalo (LENROOT; GIEDD, 2008), o que reflete no comportamento e características clínicas associadas aos transtornos. Deste modo, com o intuito de melhor entender similaridades e diferenças em nível molecular não somente entre TDM e TB, mas também na SZ - dada uma certa aproximação clínica deste transtorno com o polo

maníaco do TB - resolvemos investigar potenciais bases fisiopatológicas desses transtornos a partir de uma abordagem transcriptômica em nível central utilizando biologia de sistemas, o que nos conduz ao capítulo III desta tese.

Sendo assim, buscamos compreender potenciais mecanismos fisiopatológicos relacionados ao TB, TDM e SZ através da utilização de abordagens de bioinformática baseadas em redes para estabelecer uma assinatura regulatória transcricional no CPF de pacientes com algum desses transtornos psiquiátricos. Para tanto, conforme descrito no capítulo III desta tese, inicialmente foi analisado um conjunto de dados de expressão gênica referentes ao CPF humano saudável ao longo da vida, com o intuito de elaborar uma rede regulatória que englobasse fatores de transcrição conhecidos e os seus potenciais alvos associados, para que isso permitisse a obtenção de uma representação mais fidedigna sobre o funcionamento normal do CPF (PFAFFENSELLER et al., 2016). A seguir, a partir de conjuntos de dados de RNA-Seq ou microarranjo de amostras de tecido *post-mortem*, identificamos candidatos a reguladores mestres (regulons) para cada um dos transtornos psiquiátricos (TB, TDM e SZ) por meio de uma análise que permitiu acessar unidades regulatórias no CPF enriquecidas com genes diferencialmente expressos entre os dois fenótipos, ou seja, pacientes com transtornos psiquiátricos *versus* controles saudáveis, a fim de avaliar se a ativação ou repressão de determinados fatores de transcrição influencia as assinaturas gênicas desses transtornos nessa região cerebral. Após aplicarmos alguns filtros de seleção, essa análise resultou na identificação de 40 candidatos a reguladores mestres, considerando os três diagnósticos, os quais foram então utilizados para construir uma rede de associação com o objetivo de evidenciar as relações entre esses regulons. Então, o estado – ativado ou reprimido - de cada um desses regulons em cada conjunto de dados foi inferido através de uma análise de enriquecimento, e esta informação foi usada para verificar, através de análises de clusterização, se o padrão de atividade desses fatores de transcrição poderia distinguir os transtornos.

No geral, analisando os resultados das duas técnicas de clusterização utilizadas, observamos a formação de *cluster* que compreende, em sua totalidade ou majoritariamente, os conjuntos de dados que são relativos ao diagnóstico de TDM, e outro que concentra aqueles referentes a TB e SZ, destacando assim que, do ponto de vista transcriptômico, os desafios para diferenciar entre TB e SZ podem ser maiores do que para diferenciar esses em relação ao TDM. É interessante destacar também que boa parte dos regulons candidatos possuem o mesmo estado de ativação no TB e na SZ, mas o padrão oposto no TDM. Por outro lado, no capítulo II destacamos que foi possível diferenciar depressão bipolar de depressão unipolar através de biomarcadores séricos, o que nos sugere que a integração na utilização de biomarcadores de expressão gênica e proteica pode ser útil no propósito de diferenciar esses transtornos. Além disso, chama a atenção o fato de o EGR3 estar reprimido e o EGR1 estar predominantemente reprimido nos conjuntos de dados referentes aos três transtornos. Por este motivo, a expressão gênica de EGR1 e EGR3 foi investigada também periféricamente de modo mais direcionado, juntamente com outro gene que tem um papel no ritmo circadiano e está relacionado com esses EGRs, que é o *cryptochrome circadian regulator 2* (CRY2), o que será discutido mais adiante e que foi o foco do capítulo IV.

Outro ponto investigado, ainda no capítulo III, foi se os processos biológicos - os quais são modulados pelos reguladores mestres - envolvidos em cada transtorno seriam os mesmos, e para responder a esse questionamento realizamos uma análise de enriquecimento funcional. Porém, antes disso, aplicamos filtros de seleção para que permanecessem na análise somente os regulons mais consistentes, o que resultou em 14 deles, os quais foram então aplicados na referida análise, que retornou os processos biológicos enriquecidos em cada uma das doenças. SZ deteve o maior número de processos biológicos relacionados, seguido por TB e na sequência por TDM, este último, portanto, apresentando o menor número de processos biológicos relacionados ao fenótipo. Neste ponto, é válido destacar que o transporte e homeostase de

cálcio, assim como as vias *upstream* que modulam esses processos, mostraram-se alterados na SZ, o que pode conduzir ao mau funcionamento de inúmeras outras vias *downstream*, implicando em morte neuronal e disfunção sináptica, os quais também foram processos destacados na análise de enriquecimento funcional na SZ. Em relação ao TB, distúrbios na função sináptica e no transporte iônico transmembrana também ficaram notórios, bem como processos ligados à função imunológica e ao estresse oxidativo; já para TDM apenas dois processos foram destacados: um associado ao desenvolvimento celular glial, e outro ao metabolismo de ácidos graxos. Novamente, foi possível notar o compartilhamento de certos processos similares em destaque entre TB e SZ, e um afastamento dos processos do TDM em relação a esses, o que está de acordo com o reportado por Gandal e colegas, em que indicam que possivelmente as alterações genéticas na comunicação célula a célula exercem um papel no TB e SZ, mas não do mesmo modo no TDM (GANDAL et al., 2018).

Os processos relacionados à função imunológica e ao estresse oxidativo que se destacaram no TB também merecem atenção, uma vez que alterações em marcadores inflamatórios - como é o caso das citocinas, que representam moléculas centrais na sinalização do sistema imunológico - e de estresse oxidativo têm sido reportados com frequência em pacientes bipolares (ANDERSON; MAES, 2015; CAPUZZI et al., 2022; FRIES et al., 2019; GUIDARA et al., 2021; KIM et al., 2007; KUNZ et al., 2008, 2011; MUNKHOLM et al., 2013; PEREIRA et al., 2021; ROSENBLAT; MCINTYRE, 2016; TATAY-MANTEIGA et al., 2017). No entanto, a literatura nos mostra que alterações em marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo não são unanimidade do TB, uma vez que tanto alterações nos níveis séricos de citocinas como no número de células do sistema imunológico (BARBOSA et al., 2014; GIBNEY; DREXHAGE, 2013; GOLDSMITH; RAPAPORT; MILLER, 2016; MÜLLER, 2014), assim como nos produtos de peroxidação lipídica, dano oxidativo ao DNA e nas próprias defesas antioxidantes (AKYOL et al., 2002; ANDREAZZA et al., 2008; BLACK et al., 2015;

DIETRICH-MUSZALSKA; OLAS; RABE-JABLONSKA, 2005; NG et al., 2008) já foram reportados nas três doenças que compõem o foco central deste trabalho. Inclusive, como demonstrado no capítulo II desta tese, conjuntos de citocinas inflamatórias e marcadores de estresse oxidativo mostraram-se úteis para diferenciar tanto depressão bipolar quanto depressão unipolar de controles saudáveis, com destaque para as citocinas IL-6, IL-4 e IL-17A, as quais foram relevantes nessas duas comparações realizadas.

O fato de processos relacionados a essas vias biológicas somente aparecerem no TB em nossa análise tendo como base o tecido cerebral pode ser devido às próprias limitações do estudo, que envolvem principalmente a cronicidade das doenças, o estado de humor no momento do falecimento dos indivíduos e os medicamentos que estavam sendo utilizados pelos indivíduos, informações essas que, na maioria das vezes, não estavam facilmente disponíveis nos bancos de dados para que pudessem ser controladas. Estes elementos seriam relevantes para uma melhor discussão acerca deste ponto, visto que marcadores inflamatórios variam em decorrência do estado de humor e da cronicidade das doenças (AUDET et al., 2014; BRIETZKE et al., 2009; ORTIZ-DOMÍNGUEZ et al., 2007; VAN DEN AMEELE et al., 2016), e têm seus níveis alterados por uma série de fármacos utilizados no tratamento dos transtornos psiquiátricos (KENIS; MAES, 2002; POLLMÄCHER et al., 2000; VAN DEN AMEELE et al., 2016; ZHAN et al., 2020).

Ao avaliarmos no capítulo IV a expressão de EGR1, EGR3 e CRY2 no sangue total de pacientes psiquiátricos comparado a indivíduos saudáveis observamos que somente EGR1 apresentou redução significativa nos níveis de mRNA nos pacientes, não sendo observadas diferenças entre os grupos com relação a EGR3 e CRY2. Ao explorarmos este achado, evidenciamos que EGR1 está consistentemente reprimido nos três transtornos estudados: TB, SZ e TDM, mostrando que essa pode ser uma alteração biológica em nível molecular que se sobrepõe nesses transtornos e que vai ao encontro dos resultados obtidos no capítulo III, no

qual realizamos um estudo considerado exploratório usando biologia de sistemas, utilizando bancos de dados com amostras cerebrais, mais especificamente do CPF. Desta forma, podemos dizer que temos dados centrais e periféricos coincidentes em relação ao EGR1, o que o coloca como central nessa discussão.

Essa redução na expressão de EGR1 no TB, SZ e TDM sugere que o EGR1 pode representar parte de alguma via potencial comum que esteja na base da fisiopatologia desses transtornos. O *Egr1* é, fisiologicamente, um fator de transcrição expresso em todo o cérebro, que mantém níveis de expressão basais em importantes áreas cerebrais que participam do controle do comportamento social e emocional, memória de longa duração e cognição e sistema de recompensa, processos esses que frequentemente estão alterados nos transtornos psiquiátricos (DUCLLOT; KABBAJ, 2017). O EGR1, por pertencer à família dos IEGs, pode ser ativado no cérebro em resposta a estímulos ambientais, como o estresse (MARBALLI; GALLITANO, 2018), e, por isso, têm a capacidade de, em longo prazo, traduzir esses estímulos em alterações no SNC. Este fator de transcrição, conforme mencionado no capítulo IV, está envolvido em uma série de processos neurais, incluindo maturação neuronal via plasticidade sináptica dependente de N-metil-D-aspartato (NMDA) e é necessário para a consolidação de memória e para a fase tardia da potenciação de longa duração (LTP) (JONES et al., 2001; VEYRAC et al., 2013, 2014). A implicação do EGR1 nesses processos e em outras vias já estudadas na fisiopatologia dos transtornos psiquiátricos é mais um ponto que reforça a hipótese que este fator de transcrição, por ser influenciado por diversos fatores *upstream* e influenciar outra série de vias *downstream*, é relevante nessas doenças e deve ser melhor estudado e compreendido.

É importante ressaltar que, apesar do envolvimento do EGR1 nos processos de plasticidade sináptica estar bem documentado, os mecanismos específicos por meio dos quais o EGR1 exerce sua influência ainda não está esclarecido em sua totalidade, sendo que,

conforme destacado por Duclot e Kabbaj, a maioria dos potenciais alvos do EGR1 ainda terão que ser decifrados (DUCLLOT; KABBAJ, 2017). No entanto, alguns estudos já predisseram alvos do EGR1 em potencial, sendo que ao analisar funcionalmente vias relacionadas a esses alvos ficou claro o enriquecimento de alvos diretos que fazem parte de vias de fatores de crescimento - incluindo neurotrofinas (como o BDNF, por exemplo, já bastante associado aos transtornos psiquiátricos) – bem como genes de vias chave de sinalização intracelular, tais como Ras e proteínas cinase ativadas por mitógeno (MAPK) (DUCLLOT; KABBAJ, 2017). Curiosamente, muitos dos alvos do EGR1 estão associados com processos e vias relacionados à comunicação intercelular, tais como o reconhecimento e interação célula a célula, sugerindo que o EGR1 participa da regulação destes processos através de sua influência sobre uma grande quantidade de genes alvo.

O processo de aprendizado, por exemplo, requer uma série de modificações estruturais da sinapse, as quais necessitam da ocorrência de vários eventos intracelulares, que dependem de elementos-chave, como a via de transdução de sinal conhecida como via das MAPK, que são proteínas sinalizadoras fundamentais ativadas, por exemplo, por diversos fatores de crescimento e neurotransmissores. Estudos já demonstraram que esta via está envolvida em diferentes formas de plasticidade, incluindo a ativação de transcrição gênica, modificação estrutural da sinapse, inserção de receptores e regulação da síntese de proteínas dendríticas (DAVIS; LAROCHE, 2006). Além do mais, já foi reportado que a ativação de proteínas desta via é requerida para que ocorra a consolidação de memórias de longo prazo e há indícios de que também são necessárias para a reconsolidação de memórias (DAVIS; LAROCHE, 2006). A cinase regulada por sinais extracelulares (ERK) é membro dessa família e largamente expressa em neurônios maduros e pós-mitóticos, sendo que a cascata ERK está presente em todas as regiões encefálicas nas quais há plasticidade sináptica e a sua ativação é necessária para que haja a formação de novas memórias (ENGLISH; SWEATT, 1997). Assim, quando há um sinal

apropriado que chega ao neurônio/à sinapse, ocorre a ativação desta via através da ligação de um determinado ligante (neurotransmissor, fator de crescimento, mitógeno) a uma proteína transmembrana, que é um receptor tirosina cinase (MCCAIN, 2013). Uma vez ativados, esses receptores levam à ativação sequencial das classes centrais de cinases desta via, Ras e Raf, que por sua vez ativam MEK, que fosforila ERK1 e ERK2, as quais então translocam para o núcleo onde ativam os fatores de transcrição *downstream* Elk-1 e c-Myc, além de ativar o fator de transcrição conhecido como proteína de ligação ao elemento de resposta do AMPc (CREB) através de uma cinase intermediária - a proteína ribossomal S6 cinase (RSK) - ou da cinase ativada pelo estresse (MSK). Elk-1 e c-Myc têm sítios de ligação em vários IEGs, tais como EGR1 e c-Fos, e no próprio BDNF (DAVIS; LAROCHE, 2006). Elk-1 tem a capacidade de formar um complexo com o fator sérico de resposta (SRF) e então se ligar na região promotora denominada elemento sérico de resposta (SRE)¹ presente no EGR1 e em outros IEGs, os quais codificam, por eles próprios, fatores de transcrição. Desta forma, a indução de IEGs por meio desta via leva à alteração na expressão de diversos outros genes da cascata, instituindo novos programas de expressão gênica. Tendo em vista que esses IEGs que codificam fatores de transcrição conhecidamente ativam genes-alvo *downstream*, esta cascata de sinalização MAPK/ERK encontra-se numa posição determinante entre os sinais que iniciam a plasticidade dependente de atividade e o desfecho final, que consiste na modificação estrutural da célula.

Assim, conforme mencionado no capítulo IV, o EGR1, através de suas ações sobre genes *downstream*, modula muitos processos fundamentais para a comunicação intra e intercelular, incluindo tráfego de proteínas, transporte de vesículas sinápticas, endocitose, cascatas de sinalização intracelular e fosforilação de proteínas, tendo também como alvos alguns genes ligados a processos de degradação proteica mediada por proteossoma, sendo esta relação já descrita em células neuronais, nas quais a superexpressão de EGR1 resultou em

¹ As regiões promotoras de muitos genes cuja transcrição é induzida rapidamente e transientemente após a estimulação de um fator de crescimento ou mitógeno contêm uma sequência regulatória comum, conhecida como elemento de resposta sérico (SRE).

upregulation de proteínas relacionadas ao proteossoma, bem como de outros processos como fosforilação, transporte de íons e metabolismo (BAUMGÄRTEL et al., 2009). Desta maneira, devido à sua influência (seja esta direta ou indireta) na reorganização do citoesqueleto de actina até o controle de outros fatores transcrição através das cascatas de sinalização intracelulares, o EGR1 tem importante papel na formação e na arquitetura das sinapses, bem como na liberação de neurotransmissores, o que o coloca como um regulador mestre da atividade neuronal, com a habilidade de controlar, também por meio dos seus diversos genes alvo, níveis variados dos processos de plasticidade neuronal e sináptica de uma forma bastante abrangente. A influência do EGR1 nos processos supracitados, bem como elementos das vias de sinalização que estão ligados à sua modulação estão exemplificados na Figura 9. Nesta ilustração aparecem outros potenciais moduladores *upstream* do EGR1, como as outras cinases p38, c-Jun N-terminal cinase (JNK) e a Akt, uma serina-treonina cinase, sendo que as cascatas de proteinocinases que levam à ativação de p38 e JNK aparentemente são ativadas preferencialmente por estresse celular ou citocinas inflamatórias.

Adicionalmente, temos em destaque o NAB1, que constitui um elemento de regulação da expressão de EGR1, atuando como um correpressor, sendo que o *Egr1* medeia a indução de seu próprio repressor, evitando assim uma transativação permanente do *Egr1* e de seus genes alvo e uma reação danosa exacerbada em resposta a sinais ambientais em determinados momentos, uma vez que a repressão da transcrição gênica é crítica para a função celular, bem como para a saúde e o desenvolvimento normal de um organismo (SWIRNOFF et al., 1998). À parte disso, é importante citar também a influência dos micro-RNAs na expressão do EGR1. Nesse sentido, um miRNA já ganhou destaque, o miR-124, o qual já foi reportado como um regulador dos níveis de EGR1 no SNC, estando também associado diretamente com modulação da função neuronal e processos cognitivos superiores. Desta forma, o miR-124 pode fazer parte de um mecanismo de retroalimentação negativa que controla a expressão de EGR1 também em

nível pós-transcricional (WANG et al., 2016; YANG et al., 2012), conforme sugerido na Figura 9.

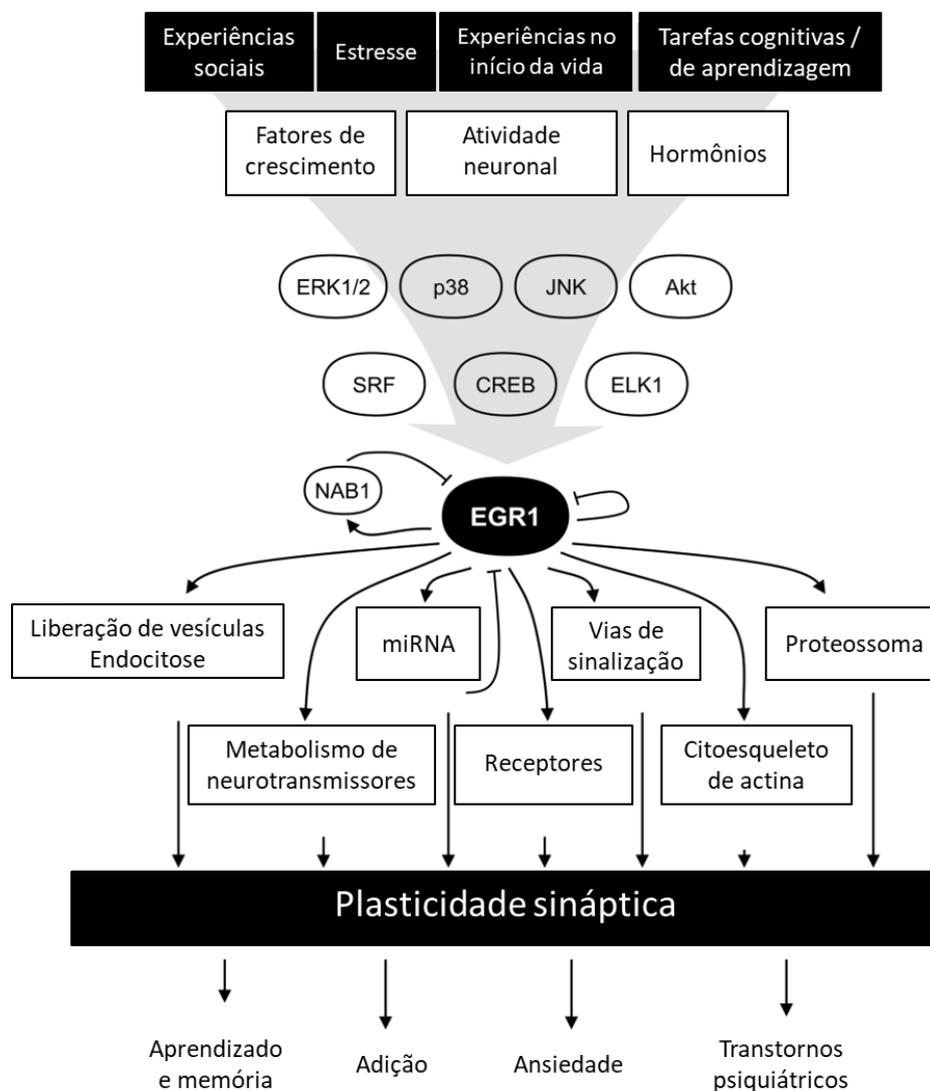


Figura 9. Representação da regulação e das funções do EGR1 no sistema nervoso central no contexto da plasticidade sináptica. Em resposta a vários estímulos como estresse ou tarefas de aprendizado/cognitivas que levam à liberação de fatores de crescimento, secreção de hormônios, ou atividade neuronal, muitas vias de sinalização intracelular, incluindo MAPK ou Akt são ativadas. Fatores de transcrição como SRF, CREB ou ELK1 são então induzidos e prontamente regulam a transcrição de *Egr1*. Conseqüentemente, EGR1 pode então regular diretamente muitos alvos transcricionais relacionados a diversas funções biológicas relativas à plasticidade sináptica: liberação de vesículas e endocitose, metabolismo de neurotransmissores, miRNA, receptores, vias de sinalização, citoesqueleto de actina, bem como componentes do complexo do proteossoma. EGR1 pode então,

através de uma série de alvos transcricionais diretos, modular múltiplos aspectos da plasticidade sináptica, e dessa forma orquestrar a integração de estímulos ambientais em nível de plasticidade sináptica, a fim de regular processos superiores como aprendizagem e memória, além de adição, ansiedade e transtornos neuropsiquiátricos. Por fim, alguns mecanismos de retroalimentação negativa também estão presentes, seja diretamente através do próprio EGR1, ou indiretamente através dos seus alvos NAB1 ou miR-124. Adaptado de *Duclot & Kabbaj, 2017*.

Diferentemente do EGR1, não houve diferença na expressão de EGR3 e CRY2 entre pacientes com TB, TDM e SZ e indivíduos saudáveis, conforme abordado no capítulo IV. No entanto, estudos já reportaram redução na expressão periférica (células sanguíneas mononucleares) de CRY2 em pacientes bipolares em episódio depressivo (LAVEBRATT et al., 2010), assim como variantes deste gene já foram associadas a TDM e TB (KOVANEN et al., 2013, 2017) e também à ciclagem rápida no TB (SJÖHOLM et al., 2010), além de genes que fazem parte do controle do ritmo circadiano – o que inclui os da família dos criptocromos (CRY1 e CRY2) – terem alterações na sua expressão reportadas em pacientes com SZ (JOHANSSON et al., 2016). Quanto ao EGR3, este já foi associado com TB (MANSOUR et al., 2009) e SZ (KIM et al., 2010; ZHANG et al., 2012) e um estudo recente mostrou redução na expressão de EGR3 no sangue periférico de pacientes com SZ comparados a controles saudáveis (NIE et al., 2021). O fato de não encontrarmos diferença entre os grupos pode ter ocorrido devido a características da amostra, por ser constituída de pacientes de um hospital terciário, referência no atendimento de casos graves e que, conforme destacado no capítulo IV, estão em uso de vários medicamentos, os quais podem ter exercido efeito sobre a expressão de EGR3 e CRY2, impedindo que diferenças fossem aparentes ao compararmos pacientes com transtornos psiquiátricos e controles. Em relação à expressão de EGR1, acreditamos que a diferença entre controles e pacientes teria sido ainda mais evidente se não tivéssemos a influência dos medicamentos. Isso porque, no geral, os medicamentos psiquiátricos modulam positivamente a plasticidade sináptica, sendo que, por exemplo, o lítio evita a redução no

comprimento dos dendritos devido ao estresse crônico em roedores (WOOD et al., 2004), o tratamento crônico com fluoxetina estimula a arborização dendrítica e a maturação de novas células granulares hipocâmpais (WANG et al., 2008), e o haloperidol, além de outros antipsicóticos, também exerce influência sobre a plasticidade sináptica (KONRADI; HECKERS, 2001).

É válido pontuar que, como destacamos no capítulo IV, não encontramos nenhuma correlação significativa entre os medicamentos individuais e a expressão dos genes em questão, ou seja, não podemos afirmar que, de fato, exercem algum efeito na expressão de EGR1, EGR3 e CRY2 na amostra estudada. Porém, temos que destacar que grande parte dos pacientes estava em uso de mais de uma medicação psiquiátrica, o que complica a avaliação de efeitos individuais de cada fármaco neste quesito, uma vez que podemos ter ainda interações entre fármacos que afetam a expressão desses genes. Ademais, também não observamos nenhuma associação dos níveis de mRNA de EGR1, EGR3 e CRY2 com escalas psiquiátricas ou características clínicas tais como intensidade de sintomas, gravidade de doença, tempo de doença e idade de início da doença, por exemplo. Apesar dessas limitações, inerentes à amostra utilizada, tivemos como resultado consistente a diminuição na expressão gênica de EGR1 nos pacientes psiquiátricos quando comparados a controles saudáveis, conforme já discutido anteriormente.

Ao avaliarmos a capacidade de EGR1, EGR3 ou CRY2 diferenciarem pacientes psiquiátricos de controles usando como base os níveis de mRNA verificamos que, conforme esperado, somente EGR1 possibilitou a distinção entre os dois grupos. Assim, utilizamos os dados de expressão de EGR1 para verificar se poderia haver uma melhor classificação de TB, TDM ou SZ individualmente *versus* controles, usando como base as características das curvas ROC obtidas, bem como se esses dados poderiam diferenciar um transtorno do outro. Observamos então que analisar individualmente cada transtorno *versus* controles não melhorou

consideravelmente as características das curvas ROC, ou seja, não se mostrou útil em relação à comparação anterior (pacientes psiquiátricos x controles) e, conseqüentemente, este dado também não teve potencial para distinguir entre pacientes dos diferentes diagnósticos (TB, TDM e SZ). Assim, essa abordagem reforça que, ao menos nas condições estudadas, a redução na expressão gênica de EGR1 é comum nesses transtornos psiquiátricos, podendo ser considerada uma característica molecular transdiagnóstica nesses termos.

De acordo com as observações contidas nesta tese, ressaltamos que a busca por biomarcadores é relevante para o entendimento da fisiopatologia dos transtornos psiquiátricos, assim como de características que se sobrepõem em transtornos distintos com similaridades na clínica. No entanto, hoje está claro que doenças complexas, como é o caso do TB, TDM e SZ, não podem ser explicadas e nem diferenciadas por um simples biomarcador sérico, principalmente quando nos referimos a transtornos com etiologia variada que envolve fatores genéticos, ambientais e sociais, dentre outros. Como vimos, às vezes nem mesmo conjuntos de biomarcadores séricos são suficientes para diferenciar de forma fidedigna transtornos ou características específicas desses. Sendo assim, torna-se cada vez mais necessário utilizarmos análises mais complexas, como as contempladas por técnicas de *machine learning*, para que biomarcadores possam vir a ser úteis no diagnóstico e/ou na resposta ao tratamento. Genes que atuam como reguladores mestres, como aqueles mencionados no capítulo III, podem trazer novos rumos na elucidação da fisiopatologia dos transtornos psiquiátricos e, conseqüentemente, tornarem-se alvos terapêuticos, principalmente pelo fato de um regulador mestre modular diversos outros genes alvo e, portanto, alterações na sua função influenciarem uma série de cascatas biológicas, conforme discutido anteriormente em relação ao regulon EGR1, que se tornou o foco principal deste trabalho.

É importante ressaltar que apesar de as vias investigadas estarem relacionadas a diversos processos cognitivos e sinápticos, a tradução direta dos achados moleculares nestes estudos para efeitos clínicos e cognitivos não foi examinada, e ainda configuram hipóteses passíveis de estudos. A característica transversal dos estudos reunidos nesta tese precluem inferências de causalidade. Além disso, não foi possível avaliar a influência direta de medicamentos e de drogas lícitas na expressão dos genes alvo, bem como nos níveis de marcadores séricos investigados.

Em suma, sugerimos que - considerando reguladores mestres, sua respectiva regulação transcricional e os processos biológicos modulados no CPF - TB e SZ possuem bases fisiopatológicas que aproximam esses transtornos e os distanciam do TDM. Além disso, temos o EGR1 ocupando uma posição de destaque, pois aparentemente desempenha um papel fundamental na fisiopatologia dos transtornos psiquiátricos, devido à sua capacidade de responder a estímulos ambientais - tais como estresse, experiências sociais e eventos traumáticos (principalmente no início da vida) - e à função que este gene exerce na plasticidade sináptica, seja diretamente ou através da sua atuação como um regulador mestre, modulando genes alvo os quais estão implicados em diversos processos relacionados à neuroplasticidade e, desta forma, influenciando vias que fazem parte da fisiopatologia dos transtornos psiquiátricos, como aquelas ligadas ao aprendizado e à memória. No entanto, vale ressaltar que é necessário confirmar essa observação em relação ao EGR1 com um número maior de indivíduos, além de verificar se a redução na expressão desse gene é consistente independente do status do transtorno e se está presente desde o início da manifestação da doença. De qualquer forma, o EGR1 surge como um potencial alvo molecular para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas. Por fim, estudos futuros poderão avaliar a possibilidade de se combinar dados de biomarcadores séricos com outras variáveis biológicas, tais como dados de genômica, transcriptômica e proteômica, bem como incluir informações clínicas nos modelos a serem

construídos, com o intuito de desenvolver com maior acurácia assinaturas biológicas relacionadas aos transtornos psiquiátricos.

5. CONCLUSÃO

Considerando os resultados obtidos nesta tese, podemos concluir que:

- A ruminação, considerada uma característica mal adaptativa comum em pacientes com transtornos psiquiátricos distintos, não apresentou associação com os níveis dos biomarcadores periféricos IL-6, IL-1 β , IL-10, TNF- α , CCL11 e BDNF. Diferentemente das variáveis biológicas, algumas variáveis clínicas - PSWQ, GAD-7, CGI-S, HDRS, severidade da doença, status socioeconômico e diagnóstico atual de Transtorno de Pânico - foram relevantes para distinguir indivíduos mais ruminadores dos menos ruminadores. Uma hipótese para a falta de associação os entre níveis de biomarcadores e ruminação reside nos fármacos que os pacientes utilizam, já que medicamento psiquiátricos conhecidamente influenciam os níveis de biomarcadores séricos.
- A utilização de biomarcadores séricos para distinguir características clínicas parecidas, como é o caso da depressão unipolar e da depressão bipolar, assim como para diferenciar indivíduos saudáveis de pacientes com transtornos psiquiátricos, ainda constitui um campo desafiador. No entanto, se nos valermos de algoritmos de *machine learning* para associar conjuntos de marcadores biológicos já sabidamente relevantes nesses transtornos, poderemos chegar a respostas mais concretas.
- Há unidades regulatórias disfuncionais no CPF de pacientes com TB, TDM e SZ, sendo que o padrão de disfunção do ponto de vista de regulação transcricional aproxima os diagnósticos de TB e SZ, ou seja, torna mais complexa a distinção entre estes dois transtornos, e os distancia do TDM.
- Transporte e homeostase de cálcio, assim como as vias *upstream* que modulam esses processos, mostraram-se alterados na SZ, o que possivelmente pode estar relacionado

ao mau funcionamento de inúmeras outras vias *downstream*, levando à morte neuronal e disfunção sináptica, os quais também foram processos evidenciados na análise de enriquecimento funcional na SZ.

- No TB, distúrbios na função sináptica e no transporte iônico transmembrana ganharam destaque, bem como processos relacionados à função imunológica e ao estresse oxidativo.
- No TDM, apenas dois processos ficaram evidentes: um ligado ao metabolismo de ácidos graxos e outro ao desenvolvimento celular glial.
- Por meio de análises de bioinformática com dados disponíveis publicamente, os IEGs EGR1 e EGR3 mostraram-se predominantemente reprimidos no CPF de pacientes com TB, TDM, SZ, demonstrando que podem fazer parte de vias fisiopatológicas moleculares comuns nos três transtornos.
- Os níveis de mRNA de EGR1 encontram-se reduzidos no sangue total de pacientes com TB, TDM e SZ quando comparado a controles, corroborando com os dados obtidos no SNC para este gene.

6. PERSPECTIVAS

- Avaliar a expressão gênica de EGR1, EGR3 e CRY2 no sangue total de pacientes psiquiátricos no início da doença e, se possível, antes do início de tratamento com fármacos; além de acompanhar o perfil de alteração na expressão desses genes de acordo com a progressão do transtorno, por meio de estudos longitudinais.
- Avaliar os potenciais alvos do EGR1, novamente com o auxílio de ferramentas de bioinformática, e a seguir validá-los por meio de imunoprecipitação de cromatina seguida de sequenciamento (ChIP-seq), para assim analisar se esse fator de transcrição precipita com os sítios de ligação ao DNA de seus alvos, de acordo com o que será previamente previsto computacionalmente. Neste ponto, seria interessante utilizar

amostras de tecido cerebral post-mortem (CPF), bem como células polimorfonucleares sanguíneas, para assim realizar uma validação em nível central e periférico e verificar se os resultados serão concordantes.

- Investigar a influência de certos miRNAs, como o já mencionado miRNA-124, sobre a expressão de EGR1 no sangue total, visto que miRNAs são expressos e altamente correlacionados no encéfalo e na periferia.
- Utilizar a estratégia de Mapas de Conectividade (CMAP) para buscar drogas candidatas para reposicionamento. Com essa abordagem, poderão ser buscados fármacos que se correlacionem negativamente com os perfis de expressão observados nos transtornos e, desta forma, o fármaco poderia ser usado para reverter a assinatura molecular da doença, ou seja, tornar-se-ia uma droga candidata para tratamento.

REFERÊNCIAS

- AKYOL, Ö. et al. The indices of endogenous oxidative and antioxidative processes in plasma from schizophrenic patients: The possible role of oxidant/antioxidant imbalance. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 26, n. 5, p. 995–1005, 1 jun. 2002.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **DSM-5 - Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais**. Edição: 5 ed. Artmed, 2014.
- ANDERSON, G.; MAES, M. Bipolar disorder: role of immune-inflammatory cytokines, oxidative and nitrosative stress and tryptophan catabolites. **Current Psychiatry Reports**, v. 17, n. 2, p. 8, fev. 2015.
- ANDREASEN, N. C. Schizophrenia: the fundamental questions. **Brain Research. Brain Research Reviews**, v. 31, n. 2–3, p. 106–112, mar. 2000.
- ANDREAZZA, A. C. et al. Oxidative stress markers in bipolar disorder: A meta-analysis. **Journal of Affective Disorders**, v. 111, n. 2, p. 135–144, 1 dez. 2008.
- ASHBURNER, M. et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. **Nature Genetics**, v. 25, n. 1, p. 25–29, maio 2000.
- AUDET, M.-C. et al. Cytokine variations and mood disorders: influence of social stressors and social support. **Frontiers in Neuroscience**, v. 8, p. 416, 16 dez. 2014.
- AVRAMOPOULOS, D. Genetics of psychiatric disorders: Methods: Molecular approaches. **The Psychiatric clinics of North America**, v. 33, n. 1, p. 1–13, mar. 2010.
- BAHN, S. et al. Gene expression profiling in the post-mortem human brain--no cause for dismay. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 22, n. 1–2, p. 79–94, jul. 2001.
- BANSAL, M. et al. How to infer gene networks from expression profiles. **Molecular Systems Biology**, v. 3, p. 78, 2007.
- BARBOSA, I. G. et al. The immunology of bipolar disorder. **Neuroimmunomodulation**, v. 21, n. 2–3, p. 117–122, 2014.

BARTON, A. J. et al. Pre- and postmortem influences on brain RNA. **Journal of Neurochemistry**, v. 61, n. 1, p. 1–11, jul. 1993.

BASSO, K. et al. Reverse engineering of regulatory networks in human B cells. **Nature Genetics**, v. 37, n. 4, p. 382–390, abr. 2005.

BAUMGÄRTEL, K. et al. Changes in the proteome after neuronal zif268 overexpression. **Journal of Proteome Research**, v. 8, n. 7, p. 3298–3316, jul. 2009.

BELMAKER, R. H. Bipolar disorder. **The New England Journal of Medicine**, v. 351, n. 5, p. 476–486, 29 jul. 2004.

BERTOLOTE, J. M.; FLEISCHMANN, A. Suicide and psychiatric diagnosis: a worldwide perspective. **World psychiatry: official journal of the World Psychiatric Association (WPA)**, v. 1, n. 3, p. 181–185, out. 2002.

BILICI, M. et al. Antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in major depression: alterations by antidepressant treatments. **Journal of Affective Disorders**, v. 64, n. 1, p. 43–51, 1 abr. 2001.

BLACK, C. N. et al. Is depression associated with increased oxidative stress? A systematic review and meta-analysis. **Psychoneuroendocrinology**, v. 51, p. 164–175, jan. 2015.

BONADIMAN, C. S. C. et al. The Burden of disease attributable to mental and substance use disorders in Brazil: Global Burden of Disease Study, 1990 and 2015. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 20, p. 191–204, maio 2017.

BOWDEN, C. L. Bipolar pathophysiology and development of improved treatments. **Brain Research**, v. 1235, p. 92–97, 15 out. 2008.

BRAINSTORM CONSORTIUM et al. Analysis of shared heritability in common disorders of the brain. **Science (New York, N.Y.)**, v. 360, n. 6395, 22 2018.

BRIETZKE, E. et al. Comparison of cytokine levels in depressed, manic and euthymic patients with bipolar disorder. **Journal of Affective Disorders**, v. 116, n. 3, p. 214–217, ago. 2009.

BURCZYNSKI, M. E.; DORNER, A. J. Transcriptional profiling of peripheral blood cells in clinical pharmacogenomic studies. **Pharmacogenomics**, v. 7, n. 2, p. 187–202, mar. 2006.

CANTOR, R. M. Chapter 9 - Analysis of Genetic Linkage. In: RIMOIN, D.; PYERITZ, R.; KORF, B. (Eds.). **Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics**. Oxford: Academic Press, 2013. p. 1–9.

CAPUZZI, E. et al. Acute variations of cytokine levels after antipsychotic treatment in drug-naïve subjects with a first-episode psychosis: A meta-analysis. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 77, p. 122–128, 1 jun. 2017.

CAPUZZI, E. et al. Malondialdehyde as a candidate biomarker for bipolar disorder: A meta-analysis. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 113, p. 110469, 8 mar. 2022.

CARRO, M. S. et al. The transcriptional network for mesenchymal transformation of brain tumours. **Nature**, v. 463, n. 7279, p. 318–325, 21 jan. 2010.

CASPI, A. et al. The p Factor: One General Psychopathology Factor in the Structure of Psychiatric Disorders? **Clinical Psychological Science: A Journal of the Association for Psychological Science**, v. 2, n. 2, p. 119–137, mar. 2014.

CASTRÉN, E. Neurotrophins and Psychiatric Disorders. In: LEWIN, G. R.; CARTER, B. D. (Eds.). **Neurotrophic Factors**. Handbook of Experimental Pharmacology. Berlin, Heidelberg: Springer, 2014. p. 461–479.

CASTRO, M. A. A. et al. Regulators of genetic risk of breast cancer identified by integrative network analysis. **Nature Genetics**, v. 48, n. 1, p. 12–21, jan. 2016.

CHOU, I.-J. et al. Familial Aggregation and Heritability of Schizophrenia and Co-aggregation of Psychiatric Illnesses in Affected Families. **Schizophrenia Bulletin**, v. 43, n. 5, p. 1070–1078, set. 2017.

COELHO, C. L. S. et al. Higher prevalence of major depressive symptoms in Brazilians aged 14 and older. **Brazilian Journal of Psychiatry**, v. 35, n. 2, p. 142–149, jun. 2013.

CRADDOCK, N.; SKLAR, P. Genetics of bipolar disorder. **Lancet (London, England)**, v. 381, n. 9878, p. 1654–1662, 11 maio 2013.

CROSS-DISORDER GROUP OF THE PSYCHIATRIC GENOMICS CONSORTIUM et al. Genetic relationship between five psychiatric disorders estimated from genome-wide SNPs. **Nature Genetics**, v. 45, n. 9, p. 984–994, set. 2013.

CURTIS, R. K.; ORESIC, M.; VIDAL-PUIG, A. Pathways to the analysis of microarray data. **Trends in Biotechnology**, v. 23, n. 8, p. 429–435, ago. 2005.

DARBY, M. M.; YOLKEN, R. H.; SABUNCIYAN, S. Consistently altered expression of gene sets in postmortem brains of individuals with major psychiatric disorders. **Translational Psychiatry**, v. 6, n. 9, p. e890, 13 2016.

DAVIDSSON, P. et al. Proteome studies of human cerebrospinal fluid and brain tissue using a preparative two-dimensional electrophoresis approach prior to mass spectrometry. **Proteomics**, v. 1, n. 3, p. 444–452, mar. 2001.

DAVIS, S.; LAROCHE, S. Mitogen-activated protein kinase/extracellular regulated kinase signalling and memory stabilization: a review. **Genes, Brain and Behavior**, v. 5, n. s2, p. 61–72, 2006.

DEBNATH, M.; CANNON, D. M.; VENKATASUBRAMANIAN, G. Variation in the major histocompatibility complex [MHC] gene family in schizophrenia: Associations and functional implications. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, Special Issue: Inflammatory Pathways as new drug targets in Schizophrenia. v. 42, p. 49–62, 5 abr. 2013.

DEMKOW, U.; WOLAŃCZYK, T. Genetic tests in major psychiatric disorders—integrating molecular medicine with clinical psychiatry—why is it so difficult? **Translational Psychiatry**, v. 7, n. 6, p. e1151, jun. 2017.

DIETRICH-MUSZALSKA, A.; OLAS, B.; RABE-JABLONSKA, J. Oxidative stress in blood platelets from schizophrenic patients. **Platelets**, v. 16, n. 7, p. 386–391, 1 nov. 2005.

DUCLOT, F.; KABBAJ, M. The Role of Early Growth Response 1 (EGR1) in Brain Plasticity and Neuropsychiatric Disorders. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 11, 2017.

ENGLISH, J. D.; SWEATT, J. D. A requirement for the mitogen-activated protein kinase cascade in hippocampal long term potentiation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 31, p. 19103–19106, 1 ago. 1997.

EUCEDA, L. R.; GISKEØDEGÅRD, G. F.; BATHEN, T. F. Preprocessing of NMR metabolomics data. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, v. 75, n. 3, p. 193–203, maio 2015.

FERNANDES, B. S. et al. Brain-derived neurotrophic factor as a state-marker of mood episodes in bipolar disorders: a systematic review and meta-regression analysis. **Journal of Psychiatric Research**, v. 45, n. 8, p. 995–1004, ago. 2011.

FERNANDES, B. S. et al. Decreased peripheral brain-derived neurotrophic factor levels are a biomarker of disease activity in major psychiatric disorders: a comparative meta-analysis. **Molecular Psychiatry**, v. 19, n. 7, p. 750–751, jul. 2014.

FLETCHER, M. N. C. et al. Master regulators of FGFR2 signalling and breast cancer risk. **Nature Communications**, v. 4, p. 2464, 2013.

FRIES, G. R. et al. Revisiting inflammation in bipolar disorder. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 177, p. 12–19, fev. 2019.

FUNAHASHI, S. Neuronal mechanisms of executive control by the prefrontal cortex. **Neuroscience Research**, v. 39, n. 2, p. 147–165, fev. 2001.

GANDAL, M. J. et al. Shared molecular neuropathology across major psychiatric disorders parallels polygenic overlap. **Science (New York, N.Y.)**, v. 359, n. 6376, p. 693–697, 09 2018.

GIBNEY, S. M.; DREXHAGE, H. A. Evidence for a dysregulated immune system in the etiology of psychiatric disorders. **Journal of Neuroimmune Pharmacology: The Official Journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology**, v. 8, n. 4, p. 900–920, set. 2013.

GLADKEVICH, A.; KAUFFMAN, H. F.; KORF, J. Lymphocytes as a neural probe: potential for studying psychiatric disorders. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 28, n. 3, p. 559–576, maio 2004.

GOLDSMITH, D. R.; RAPAPORT, M. H.; MILLER, B. J. A meta-analysis of blood cytokine network alterations in psychiatric patients: comparisons between schizophrenia, bipolar disorder and depression. **Molecular Psychiatry**, v. 21, n. 12, p. 1696–1709, 2016.

GOUIN, J.-P. et al. Chronic stress, daily stressors, and circulating inflammatory markers. **Health Psychology: Official Journal of the Division of Health Psychology, American Psychological Association**, v. 31, n. 2, p. 264–268, mar. 2012.

GREEN, M. J. et al. Brain-derived neurotrophic factor levels in schizophrenia: a systematic review with meta-analysis. **Molecular Psychiatry**, v. 16, n. 9, p. 960–972, set. 2011.

GUIDARA, W. et al. Predictive value of oxidative stress biomarkers in drug-free patients with bipolar disorder. **Nordic Journal of Psychiatry**, p. 1–12, 29 dez. 2021.

HALLAK, J. E. C.; CHAVES, C.; ZUARDI, A. W. Esquizofrenia. In: **Bases Biológicas dos Transtornos Psiquiátricos: Uma Abordagem Translacional**. [s.l.] Artmed Editora, 2009. p. 195–210.

HARRIS, M. A. et al. The Gene Ontology (GO) database and informatics resource. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. Database issue, p. D258-261, 1 jan. 2004.

HARRISON, P. J. et al. Terminal coma affects messenger RNA detection in post mortem human temporal cortex. **Brain Research. Molecular Brain Research**, v. 9, n. 1–2, p. 161–164, jan. 1991.

HARRISON, P. J.; GEDDES, J. R.; TUNBRIDGE, E. M. The Emerging Neurobiology of Bipolar Disorder. **Trends in Neurosciences**, v. 41, n. 1, p. 18–30, 2018.

HARRISON, P. J.; OWEN, M. J. Genes for schizophrenia? Recent findings and their pathophysiological implications. **Lancet (London, England)**, v. 361, n. 9355, p. 417–419, 1 fev. 2003.

HASLER, G. Pathophysiology of depression: do we have any solid evidence of interest to clinicians? **World psychiatry: official journal of the World Psychiatric Association (WPA)**, v. 9, n. 3, p. 155–161, out. 2010.

HEBE BRAND, J. et al. Child and adolescent psychiatric genetics. **European Child & Adolescent Psychiatry**, v. 19, n. 3, p. 259–279, 1 mar. 2010.

HENRIKSEN, M. G.; NORDGAARD, J.; JANSSON, L. B. Genetics of Schizophrenia: Overview of Methods, Findings and Limitations. **Frontiers in Human Neuroscience**, v. 11, 2017.

HERKEN, H. et al. Evidence that the activities of erythrocyte free radical scavenging enzymes and the products of lipid peroxidation are increased in different forms of schizophrenia. **Molecular Psychiatry**, v. 6, n. 1, p. 66–73, jan. 2001.

HOEHE, M. R.; MORRIS-ROSENDAHL, D. J. The role of genetics and genomics in clinical psychiatry. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 20, n. 3, p. 169–177, set. 2018.

HUANG, D. W.; SHERMAN, B. T.; LEMPICKI, R. A. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. 1, p. 1–13, 1 jan. 2009.

HYMAN, S. E. The genetics of mental illness: implications for practice. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 78, p. 455–463, 2000.

HYND, M. R. et al. Biochemical and molecular studies using human autopsy brain tissue. **Journal of Neurochemistry**, v. 85, n. 3, p. 543–562, maio 2003.

INTERNATIONAL SCHIZOPHRENIA CONSORTIUM et al. Common polygenic variation contributes to risk of schizophrenia and bipolar disorder. **Nature**, v. 460, n. 7256, p. 748–752, 6 ago. 2009.

JOHANSSON, A.-S. et al. Altered circadian clock gene expression in patients with schizophrenia. **Schizophrenia Research**, v. 174, n. 1–3, p. 17–23, jul. 2016.

JOHNSON, L. A.; FERRIS, J. A. J. Analysis of postmortem DNA degradation by single-cell gel electrophoresis. **Forensic Science International**, v. 126, n. 1, p. 43–47, 28 mar. 2002.

JONES, M. W. et al. A requirement for the immediate early gene Zif268 in the expression of late LTP and long-term memories. **Nature Neuroscience**, v. 4, n. 3, p. 289–296, mar. 2001.

KÁLMÁN, J. et al. Gene expression profile analysis of lymphocytes from Alzheimer's patients. **Psychiatric Genetics**, v. 15, n. 1, p. 1–6, mar. 2005.

KANEHISA, M.; GOTO, S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 1, p. 27–30, 1 jan. 2000.

KARLEBACH, G.; SHAMIR, R. Modelling and analysis of gene regulatory networks. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 10, p. 770–780, out. 2008.

KENDLER, K. S. “A gene for...”: the nature of gene action in psychiatric disorders. **The American Journal of Psychiatry**, v. 162, n. 7, p. 1243–1252, jul. 2005.

KENDLER, K. S.; GRUENBERG, A. M.; KINNEY, D. K. Independent Diagnoses of Adoptees and Relatives As Defined by DSM-III in the Provincial and National Samples of the Danish Adoption Study of Schizophrenia. **Archives of General Psychiatry**, v. 51, n. 6, p. 456–468, 1 jun. 1994.

KENIS, G.; MAES, M. Effects of antidepressants on the production of cytokines. **The International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 5, n. 4, p. 401–412, dez. 2002.

KESSLER, R. C. et al. Prevalence, Severity, and Comorbidity of Twelve-month DSM-IV Disorders in the National Comorbidity Survey Replication (NCS-R). **Archives of general psychiatry**, v. 62, n. 6, p. 617–627, jun. 2005.

KHATRI, P.; DRĂGHICI, S. Ontological analysis of gene expression data: current tools, limitations, and open problems. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 21, n. 18, p. 3587–3595, 15 set. 2005.

KIM, S. H. et al. EGR3 as a potential susceptibility gene for schizophrenia in Korea. **American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics**, v. 153B, n. 7, p. 1355–1360, 2010.

KIM, Y.-K. et al. Imbalance between pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in bipolar disorder. **Journal of Affective Disorders**, v. 104, n. 1–3, p. 91–95, dez. 2007.

KITANO, H. Systems Biology: A Brief Overview. **Science**, v. 295, n. 5560, p. 1662–1664, 1 mar. 2002.

KONRADI, C.; HECKERS, S. Antipsychotic Drugs and Neuroplasticity: Insights into the Treatment and Neurobiology of Schizophrenia. **Biological psychiatry**, v. 50, n. 10, p. 729–742, 15 nov. 2001.

KOVANEN, L. et al. CRY2 Genetic Variants Associate with Dysthymia. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, p. e71450, 8 ago. 2013.

KOVANEN, L. et al. PRKCDBP (CAVIN3) and CRY2 associate with major depressive disorder. **Journal of Affective Disorders**, v. 207, p. 136–140, 1 jan. 2017.

KUNZ, M. et al. Elevated serum superoxide dismutase and thiobarbituric acid reactive substances in different phases of bipolar disorder and in schizophrenia. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 32, n. 7, p. 1677–1681, 1 out. 2008.

KUNZ, M. et al. Serum levels of IL-6, IL-10 and TNF- α in patients with bipolar disorder and schizophrenia: differences in pro- and anti-inflammatory balance. **Revista Brasileira De Psiquiatria (Sao Paulo, Brazil: 1999)**, v. 33, n. 3, p. 268–274, set. 2011.

KUPFER, D. J.; KUHL, E. A.; REGIER, D. A. DSM-5--the future arrived. **JAMA**, v. 309, n. 16, p. 1691–1692, 24 abr. 2013.

LANDER, E. S. et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. **Nature**, v. 409, n. 6822, p. 860–921, fev. 2001.

LAVEBRATT, C. et al. CRY2 is associated with depression. **PloS One**, v. 5, n. 2, p. e9407, 24 fev. 2010.

LEE, W.-P.; TZOU, W.-S. Computational methods for discovering gene networks from expression data. **Briefings in Bioinformatics**, v. 10, n. 4, p. 408–423, jul. 2009.

LEFEBVRE, C. et al. A human B-cell interactome identifies MYB and FOXM1 as master regulators of proliferation in germinal centers. **Molecular Systems Biology**, v. 6, p. 377, 8 jun. 2010.

LENROOT, R. K.; GIEDD, J. N. The changing impact of genes and environment on brain development during childhood and adolescence: Initial findings from a neuroimaging study of pediatric twins. **Development and psychopathology**, v. 20, n. 4, p. 1161–1175, 2008.

LIBERZON, A. et al. The Molecular Signatures Database (MSigDB) hallmark gene set collection. **Cell Systems**, v. 1, n. 6, p. 417–425, 23 dez. 2015.

LIN, C.-C.; HUANG, T.-L. Brain-derived neurotrophic factor and mental disorders. **Biomedical Journal**, v. 43, n. 2, p. 134–142, 1 abr. 2020.

LIU, Z.-P. Reverse Engineering of Genome-wide Gene Regulatory Networks from Gene Expression Data. **Current Genomics**, v. 16, n. 1, p. 3–22, fev. 2015.

LOPEZ, A. D.; MURRAY, C. C. The global burden of disease, 1990–2020. **Nature Medicine**, v. 4, n. 11, p. 1241–1243, nov. 1998.

LUDES, B.; PFITZINGER, H.; MANGIN, P. DNA fingerprinting from tissues after variable postmortem periods. **Journal of Forensic Sciences**, v. 38, n. 3, p. 686–690, maio 1993.

MAES, O. C. et al. Transcriptional profiling of Alzheimer blood mononuclear cells by microarray. **Neurobiology of Aging**, v. 28, n. 12, p. 1795–1809, dez. 2007.

MANSOUR, H. A. et al. Association study of 21 circadian genes with bipolar I disorder, schizoaffective disorder, and schizophrenia. **Bipolar Disorders**, v. 11, n. 7, p. 701–710, 2009.

MANZONI, C. et al. Genome, transcriptome and proteome: the rise of omics data and their integration in biomedical sciences. **Briefings in Bioinformatics**, v. 19, n. 2, p. 286–302, 01 2018.

MARBALLI, K. K.; GALLITANO, A. L. Immediate Early Genes Anchor a Biological Pathway of Proteins Required for Memory Formation, Long-Term Depression and Risk for Schizophrenia. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 12, 2018.

MARGOLIN, A. A. et al. Reverse engineering cellular networks. **Nature Protocols**, v. 1, n. 2, p. 662–671, 2006a.

MARGOLIN, A. A. et al. ARACNE: an algorithm for the reconstruction of gene regulatory networks in a mammalian cellular context. **BMC bioinformatics**, v. 7 Suppl 1, p. S7, 20 mar. 2006b.

MARSLAND, A. L. et al. The effects of acute psychological stress on circulating and stimulated inflammatory markers: A systematic review and meta-analysis. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 64, p. 208–219, ago. 2017.

MARTINS-DE-SOUZA, D. Biomarkers for psychiatric disorders: where are we standing? **Disease Markers**, v. 35, n. 1, p. 1–2, 2013.

MATSUBARA, T. et al. Reduced Glucocorticoid Receptor alpha Expression in Mood Disorder Patients and First-Degree Relatives. **Biological Psychiatry**, v. 59, n. 8, p. 689–695, 15 abr. 2006.

MCCAIN, J. The MAPK (ERK) Pathway. **Pharmacy and Therapeutics**, v. 38, n. 2, p. 96–108, fev. 2013.

MCGUFFIN, P. et al. A Hospital-Based Twin Register of the Heritability of DSM-IV Unipolar Depression. **Archives of General Psychiatry**, v. 53, n. 2, p. 129–136, 1 fev. 1996.

MESAROVIC, M. D.; SREENATH, S. N.; KEENE, J. D. Search for organising principles: understanding in systems biology. **Systems Biology**, v. 1, n. 1, p. 19–27, jun. 2004.

MILLER, B. J. et al. Meta-analysis of lymphocytes in schizophrenia: clinical status and antipsychotic effects. **Biological Psychiatry**, v. 73, n. 10, p. 993–999, 15 maio 2013.

MOLENDIJK, M. L. et al. Serum BDNF concentrations as peripheral manifestations of depression: evidence from a systematic review and meta-analyses on 179 associations (N =9484). **Molecular Psychiatry**, v. 19, n. 7, p. 791–800, jul. 2014.

MOYLAN, S. et al. The neuroprogressive nature of major depressive disorder: pathways to disease evolution and resistance, and therapeutic implications. **Molecular Psychiatry**, v. 18, n. 5, p. 595–606, maio 2013.

MÜLLER, N. Immunology of major depression. **Neuroimmunomodulation**, v. 21, n. 2–3, p. 123–130, 2014.

MUNKHOLM, K. et al. Cytokines in bipolar disorder vs. healthy control subjects: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Psychiatric Research**, v. 47, n. 9, p. 1119–1133, set. 2013.

NASSAR, A.; AZAB, A. N. Effects of Lithium on Inflammation. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 5, n. 6, p. 451–458, 25 abr. 2014.

NATIONAL INSTITUTE OF MENTAL HEALTH. **About RDoC**. Disponível em: <<https://www.nimh.nih.gov/research/research-funded-by-nimh/rdoc/about-rdoc>>. Acesso em: 21 jan. 2022.

NG, F. et al. Oxidative stress in psychiatric disorders: evidence base and therapeutic implications. **The International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 11, n. 6, p. 851–876, set. 2008.

NIE, F. et al. Schizophrenia risk candidate EGR3 is a novel transcriptional regulator of RELN and regulates neurite outgrowth via the Reelin signal pathway in vitro. **Journal of Neurochemistry**, v. 157, n. 6, p. 1745–1758, jun. 2021.

NIJHOUT, H. F.; BEST, J. A.; REED, M. C. Systems biology of robustness and homeostatic mechanisms. **WIREs Systems Biology and Medicine**, v. 11, n. 3, p. e1440, 2019.

NOLEN-HOEKSEMA, S.; WISCO, B. E.; LYUBOMIRSKY, S. Rethinking Rumination. **Perspectives on Psychological Science: A Journal of the Association for Psychological Science**, v. 3, n. 5, p. 400–424, set. 2008.

NURNBERGER, J. I.; BERRETTINI, W.; NICULESCU, A. B. Genetics of Psychiatric Disorders. In: FATEMI, S. H.; CLAYTON, P. J. (Eds.). **The Medical Basis of Psychiatry**. New York, NY: Springer, 2016. p. 553–600.

OLTVAI, Z. N.; BARABÁSI, A.-L. Systems biology. Life's complexity pyramid. **Science (New York, N.Y.)**, v. 298, n. 5594, p. 763–764, 25 out. 2002.

ORTIZ-DOMÍNGUEZ, A. et al. Immune variations in bipolar disorder: phasic differences. **Bipolar Disorders**, v. 9, n. 6, p. 596–602, set. 2007.

PEREIRA, A. C. et al. Inflammation in Bipolar Disorder (BD): Identification of new therapeutic targets. **Pharmacological Research**, v. 163, p. 105325, jan. 2021.

PFÄFFENSELLER, B. et al. Differential expression of transcriptional regulatory units in the prefrontal cortex of patients with bipolar disorder: potential role of early growth response gene 3. **Translational Psychiatry**, v. 6, p. e805, 10 2016.

PFÄFFENSELLER, B. et al. EGR3 Immediate Early Gene and the Brain-Derived Neurotrophic Factor in Bipolar Disorder. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 12, p. 15, 2018.

PIAO, G. et al. A computational procedure for identifying master regulator candidates: a case study on diabetes progression in Goto-Kakizaki rats. **BMC systems biology**, v. 6 Suppl 1, p. S2, 2012.

PINTO, J. V.; MOULIN, T. C.; AMARAL, O. B. On the transdiagnostic nature of peripheral biomarkers in major psychiatric disorders: A systematic review. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 83, p. 97–108, dez. 2017.

POLLMÄCHER, T. et al. Effects of antipsychotic drugs on cytokine networks. **Journal of Psychiatric Research**, v. 34, n. 6, p. 369–382, dez. 2000.

RANJEKAR, P. K. et al. Decreased antioxidant enzymes and membrane essential polyunsaturated fatty acids in schizophrenic and bipolar mood disorder patients. **Psychiatry Research**, v. 121, n. 2, p. 109–122, 1 dez. 2003.

RAZA, M. U. et al. DNA Damage in Major Psychiatric Diseases. **Neurotoxicity Research**, v. 30, n. 2, p. 251–267, 1 ago. 2016.

REIMAND, J. et al. Pathway enrichment analysis and visualization of omics data using g:Profiler, GSEA, Cytoscape and EnrichmentMap. **Nature Protocols**, v. 14, n. 2, p. 482–517, fev. 2019.

RIEMER, S. et al. Lowered omega-3 PUFAs are related to major depression, but not to somatization syndrome. **Journal of Affective Disorders**, v. 123, n. 1–3, p. 173–180, jun. 2010.

ROMANO-SILVA, M. A.; NICOLATO, R.; CORRÊA, H. Genética dos transtornos psiquiátricos. In: KAPCZINSKI, F.; IZQUIERDO, I.; QUEVEDO, J. (Eds.). **Bases Biológicas dos Transtornos Psiquiátricos: Uma Abordagem Translacional**. 3^a ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2011. p. 87–97.

ROSENBLAT, J. D.; MCINTYRE, R. S. Bipolar Disorder and Inflammation. **The Psychiatric Clinics of North America**, v. 39, n. 1, p. 125–137, mar. 2016.

SANISLOW, C. A. et al. Developing constructs for psychopathology research: research domain criteria. **Journal of Abnormal Psychology**, v. 119, n. 4, p. 631–639, nov. 2010.

SAUNDERS, K. E. A.; GEDDES, J. R. The management of bipolar disorder. **British Journal of Hospital Medicine (London, England: 2005)**, v. 77, n. 3, p. 175–179, mar. 2016.

SCHUCH, J. J. J. et al. Gender differences in major depressive disorder: Results from the Netherlands study of depression and anxiety. **Journal of Affective Disorders**, v. 156, p. 156–163, 1 mar. 2014.

SIGITOVA, E. et al. Biological hypotheses and biomarkers of bipolar disorder. **Psychiatry and Clinical Neurosciences**, v. 71, n. 2, p. 77–103, fev. 2017.

SINGH, R. S. Polymorphism. In: BRENNER, S.; MILLER, J. H. (Eds.). **Encyclopedia of Genetics**. New York: Academic Press, 2001. p. 1507–1509.

SJÖHOLM, L. K. et al. CRY2 is associated with rapid cycling in bipolar disorder patients. **PloS One**, v. 5, n. 9, p. e12632, 9 set. 2010.

SMOLLER, J. W.; FINN, C. T. Family, twin, and adoption studies of bipolar disorder. **American Journal of Medical Genetics. Part C, Seminars in Medical Genetics**, v. 123C, n. 1, p. 48–58, 15 nov. 2003.

SOUZA, F. G. DE M. E. Tratamento do transtorno bipolar: eutimia. **Archives of Clinical Psychiatry (São Paulo)**, v. 32, p. 63–70, 2005.

SUBRAMANIAN, A. et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 43, p. 15545–15550, 25 out. 2005.

SULLIVAN, P. F. The psychiatric GWAS consortium: big science comes to psychiatry. **Neuron**, v. 68, n. 2, p. 182–186, 21 out. 2010.

SULLIVAN, P. F.; KENDLER, K. S.; NEALE, M. C. Schizophrenia as a complex trait: evidence from a meta-analysis of twin studies. **Archives of General Psychiatry**, v. 60, n. 12, p. 1187–1192, dez. 2003.

SULLIVAN, P. F.; NEALE, M. C.; KENDLER, K. S. Genetic epidemiology of major depression: review and meta-analysis. **The American Journal of Psychiatry**, v. 157, n. 10, p. 1552–1562, out. 2000.

SUN, D. et al. CEA: Combination-based gene set functional enrichment analysis. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 13085, 30 ago. 2018.

SUPPES, T.; DENNEHY, E. B. **Transtorno Bipolar. As Mais Recentes Estratégias de Avaliação e Tratamento.** [s.l.] Artmed, 2009.

SWIRNOFF, A. H. et al. Nab1, a Corepressor of NGFI-A (Egr-1), Contains an Active Transcriptional Repression Domain. **Molecular and Cellular Biology**, v. 18, n. 1, p. 512–524, jan. 1998.

TATAY-MANTEIGA, A. et al. Clinical staging and serum cytokines in bipolar patients during euthymia. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 77, p. 194–201, 3 jul. 2017.

THOMAS, P. et al. Differences among Men and Women with Schizophrenia: A Study of US and Indian Samples. **Psychiatry Investigation**, v. 7, n. 1, p. 9–16, mar. 2010.

TORSHIZI, A. D. et al. Deconvolution of transcriptional networks identifies TCF4 as a master regulator in schizophrenia. **Science Advances**, v. 5, n. 9, p. eaau4139, 1 set. 2019.

VAILATI-RIBONI, M.; PALOMBO, V.; LOOR, J. J. What Are Omics Sciences? In: AMETAJ, B. N. (Ed.). . **Periparturient Diseases of Dairy Cows: A Systems Biology Approach.** Cham: Springer International Publishing, 2017. p. 1–7.

VAN DEN AMEELE, S. et al. The effect of mood-stabilizing drugs on cytokine levels in bipolar disorder: A systematic review. **Journal of Affective Disorders**, v. 203, p. 364–373, out. 2016.

VEYRAC, A. et al. Zif268/egr1 gene controls the selection, maturation and functional integration of adult hippocampal newborn neurons by learning. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 17, p. 7062–7067, 23 abr. 2013.

VEYRAC, A. et al. The transcription factor Zif268/Egr1, brain plasticity, and memory. **Progress in Molecular Biology and Translational Science**, v. 122, p. 89–129, 2014.

WANG, B. et al. MiR124 suppresses collagen formation of human tendon derived stem cells through targeting egr1. **Experimental Cell Research**, v. 347, n. 2, p. 360–366, 1 out. 2016.

WANG, J.-W. et al. Chronic Fluoxetine Stimulates Maturation and Synaptic Plasticity of Adult-Born Hippocampal Granule Cells. **Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 6, p. 1374–1384, 6 fev. 2008.

WANG, L. et al. Effects of SSRIs on peripheral inflammatory markers in patients with major depressive disorder: A systematic review and meta-analysis. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 79, p. 24–38, 1 jul. 2019.

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nature Reviews. Genetics**, v. 10, n. 1, p. 57–63, jan. 2009.

WHITEFORD, H. A. et al. Global burden of disease attributable to mental and substance use disorders: findings from the Global Burden of Disease Study 2010. **The Lancet**, v. 382, n. 9904, p. 1575–1586, 9 nov. 2013.

WOOD, G. E. et al. Stress-induced structural remodeling in hippocampus: prevention by lithium treatment. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 11, p. 3973–3978, 16 mar. 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Depression and other common mental disorders: global health estimates**. 2017. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/254610>

YANG, Y. et al. EPAC null mutation impairs learning and social interactions via aberrant regulation of miR-124 and Zif268 translation. **Neuron**, v. 73, n. 4, p. 774–788, 23 fev. 2012.

YATES, C. M. et al. Enzyme activities in relation to pH and lactate in postmortem brain in Alzheimer-type and other dementias. **Journal of Neurochemistry**, v. 55, n. 5, p. 1624–1630, nov. 1990.

ZHAN, Y. et al. Alterations of multiple peripheral inflammatory cytokine levels after repeated ketamine infusions in major depressive disorder. **Translational Psychiatry**, v. 10, n. 1, p. 1–9, 22 jul. 2020.

ZHANG, R. et al. Genetic evidence for the association between the early growth response 3 (EGR3) gene and schizophrenia. **PloS One**, v. 7, n. 1, p. e30237, 2012.

ANEXOS

ANEXO A: Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa - Projeto 2019-0025.

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação transdiagnóstica da expressão do fator de transcrição Early Growth Response 3 (EGR3) e de potenciais genes-alvo no Transtorno Bipolar, na Esquizofrenia e na Depressão Maior.

Pesquisador: Marcia Kauer SantAnna

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 06539118.6.0000.5327

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Patrocinador Principal: Hospital de Clínicas de Porto Alegre
Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.166.894

Apresentação do Projeto:

Projeto do PPG-Psiquiatria. Visa avaliar a hipótese que nos pacientes com transtornos psiquiátricos a expressão gênica do EGR3 está reduzida em relação aos controles saudáveis, independentemente do transtorno psiquiátrico diagnosticado (TB, SZ ou DM), o que afetará diretamente na regulação de potenciais genes-alvo deste fator de transcrição (EGR1, OMG, RGS4, HTR2A, GABRA1, CRY2, CRHBP). Nos últimos anos, o estudo sobre a neurobiologia dessas doenças tem crescido, trazendo importantes avanços na compreensão dessas condições, cujas causas podem ser consideradas multifatoriais. No entanto, a fisiopatologia desses transtornos ainda não está completamente elucidada. Neste contexto, o estudo da família de genes Immediate Early Genes (IEG) tem despertado maior interesse no campo da psiquiatria devido ao fato de estes genes apresentarem o potencial de traduzir estímulos ambientais em alterações em longo prazo no cérebro, além de possivelmente influenciarem no risco para transtornos psiquiátricos. O fator de transcrição Early Growth Response 3 (EGR3) pertence à família IEG e, assim como outros membros desta família, pode ser ativado no cérebro em resposta a estímulos ambientais, como o estresse. EGR3 regula uma série de genes-alvo que atuam em processos neurobiológicos críticos, tais como plasticidade sináptica, memória e cognição – processos estes que estão alterados nas doenças psiquiátricas. Adicionalmente, a expressão de EGR3 é induzida pelo fator neurotrófico derivado do

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229

Bairro: Santa Cecília

CEP: 90.035-903

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3359-7640

Fax: (51)3359-7640

E-mail: cep@hcpa.edu.br

Continuação do Parecer: 3.166.894

cérebro (BDNF), essencial para o desenvolvimento do sistema nervoso e desempenho cognitivo durante a vida adulta, o qual tem sido consistentemente relacionado à fisiopatologia de transtornos psiquiátricos. Desta forma, estudos são necessários para entender a relação entre EGR3 e BDNF e o possível papel desta via biológica nos transtornos mentais, o que pode identificar potenciais alvos para novas terapias. Assim, o objetivo deste estudo está centrado em compreender o envolvimento do fator de transcrição EGR3, assim como de alguns de seus potenciais genes-alvo - EGR1, OMG, RGS4, HTR2A, GABRA1, CRY2, CRHBP - e do gene BDNF, de forma concomitante, na fisiopatologia de transtornos psiquiátricos maiores (Transtorno Bipolar, Esquizofrenia e Depressão Maior).

Alterações em fatores de transcrição que fazem a translação de efeitos ambientais para mudanças biológicas, como é o caso do EGR3, poderiam estar associadas a uma maior vulnerabilidade ao estresse de pacientes psiquiátricos e poderiam auxiliar a compreender porque eventos estressantes muitas vezes desencadeiam episódios da doença e aumentam a gravidade dos sintomas.

O estudo a ser realizado trata-se de um estudo observacional analítico transversal.

A amostra será constituída por pacientes oriundos de outros 3 projetos já aprovados e em curso. Algumas amostras já foram coletadas e estão armazenadas. Tamanho amostral de 80 (20 adultos com esquizofrenia, 20 com depressão e 20 bipolares, além de 20 controles saudáveis).

O estudo está associado a outros 3 estudos: As amostras biológicas a serem utilizadas foram ou estão sendo coletadas dentro de projetos vigentes que preveem o uso do material biológico para experimentos envolvendo análises biológicas, os quais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa/HCPA, conforme segue: Pacientes com TB: Projeto 2017-0029 (Somente a primeira coleta – W00) – Profª responsável: Drª. Márcia Kauer Sant'Anna; Pacientes com DM: Projeto 2016-0540 – Prof. responsável: Dr. Marcelo Pio de Almeida Fleck; Pacientes com SZ: Projeto 2015-0282 - Profª responsável: Clarissa Severino Gama; Controles: Projeto 2015-0282 - Profª responsável: Clarissa Severino Gama. Todos os pesquisadores responsáveis citados acima fazem parte do presente projeto

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo geral

Compreender o envolvimento do gene EGR3, assim como de alguns de seus potenciais genes-alvo e do gene do BDNF, de forma concomitante, na fisiopatologia de transtornos psiquiátricos maiores

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229

Bairro: Santa Cecília

CEP: 90.035-903

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3359-7640

Fax: (51)3359-7640

E-mail: cep@hcpa.edu.br

Continuação do Parecer: 3.166.894

(TB, SZ e DM).

Objetivos específicos

- Analisar a expressão gênica do EGR3 em pacientes com transtornos psiquiátricos comparados a controles saudáveis;
- Comparar os níveis de expressão do gene EGR3 entre os pacientes com TB, SZ e DM;
- Analisar a expressão de potenciais genes-alvo do EGR3 - EGR1, OMG, RGS4, HTR2A, GABRA1, CRY2, CRHBP – em pacientes com transtornos psiquiátricos comparados a controles; • Comparar os níveis de expressão de potenciais genes-alvo do EGR3 - EGR1, OMG, RGS4, HTR2A, GABRA1, CRY2, CRHBP – entre pacientes com TB, SZ e DM.
- Analisar a expressão do gene do BDNF em pacientes com transtornos psiquiátricos comparados a controles;
- Comparar os níveis de expressão gênica do BDNF entre os pacientes com TB, SZ e DM.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Não são conhecidos riscos aos indivíduos, pois a coleta de sangue já está prevista em cada projeto citado.

Benefícios: Não são esperados benefícios diretos aos indivíduos ao participarem deste estudo, porém o presente projeto poderá auxiliar para um melhor entendimento da fisiopatologia dos transtornos psiquiátricos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um projeto de pesquisa com questões que seguem em aberto na literatura, portando que pode trazer sólidas contribuições. Grupos de pesquisa com expertise em trabalhos desta natureza.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresenta TCLE.

Solicitação de dispensa quando da impossibilidade de obtenção de consentimento:

A participação dos indivíduos nos projetos de pesquisa citados é solicitada e, em caso de aceite, os pacientes/controles assinam o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Os TCLEs

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229

Bairro: Santa Cecília

CEP: 90.035-903

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3359-7640

Fax: (51)3359-7640

E-mail: cep@hcpa.edu.br

Continuação do Parecer: 3.166.894

aprovados referentes a cada projeto original citado encontram-se em anexo. 11 Considerando que os três projetos citados encontram-se em curso, grande parte das amostras que serão utilizadas neste projeto já se encontram coletadas e algumas delas virão a ser coletadas nos próximos meses. Desta forma, será adotado o seguinte procedimento: a) Em relação aos controles, as amostras necessárias para este projeto já foram coletadas. Desta forma, solicitamos a dispensa de aplicação do TCLE para estes indivíduos, visto que não têm data prevista para que eles retornem ao HCPA. b) No caso de as amostras já terem sido coletadas e os pacientes retornarem para acompanhamento no HCPA, será aplicado um novo TCLE, apresentado neste projeto, solicitando autorização do indivíduo para que o material biológico seja utilizado neste estudo; c) No caso de as amostras já terem sido coletadas e o paciente não retornar para acompanhamento do HCPA, solicitamos a dispensa da aplicação de um novo TCLE, visto que o acesso a esses indivíduos seria dificultado pelo fato de muitos não residirem em Porto Alegre e/ou já terem retornado para acompanhamento em suas Unidades Básicas de Saúde. Além disso, nesses casos, o processo geraria um ônus para os indivíduos, visto que teriam que se deslocar até o HCPA; d) No caso de novos recrutamentos, o TCLE do presente projeto será aplicado juntamente com o TCLE do projeto principal por um pesquisador que está envolvido nos dois projetos.

Recomendações:

Nada a recomendar.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto não apresenta pendências e está em condições de aprovação.

Considerações Finais a critério do CEP:

Lembramos que a presente aprovação (projeto versão 17/12/2018, TCLE versão 17/12/2018 e demais documentos que atendem às solicitações do CEP) refere-se apenas aos aspectos éticos e metodológicos do projeto.

Os pesquisadores devem atentar ao cumprimento dos seguintes itens:

- a) Este projeto está aprovado para inclusão de 80 participantes no Centro HCPA, de acordo com as informações do projeto ou do Plano de Recrutamento apresentado. Qualquer alteração deste número deverá ser comunicada ao CEP e ao Serviço de Gestão em Pesquisa para autorizações e atualizações cabíveis.
- b) O projeto deverá ser cadastrado no sistema AGHUse Pesquisa para fins de avaliação logística e

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229

Bairro: Santa Cecília

CEP: 90.035-903

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3359-7640

Fax: (51)3359-7640

E-mail: cep@hcpa.edu.br

Continuação do Parecer: 3.166.894

financeira e somente poderá ser iniciado após aprovação final do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação.

c) Qualquer alteração nestes documentos deverá ser encaminhada para avaliação do CEP. Informamos que obrigatoriamente a versão do TCLE a ser utilizada deverá corresponder na íntegra à versão vigente aprovada.

d) Deverão ser encaminhados ao CEP relatórios semestrais e um relatório final do projeto.

e) A comunicação de eventos adversos classificados como sérios e inesperados, ocorridos com pacientes incluídos no centro HCPA, assim como os desvios de protocolo quando envolver diretamente estes pacientes, deverá ser realizada através do Sistema GEO (Gestão Estratégica Operacional) disponível na intranet do HCPA.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1271399.pdf	29/01/2019 16:25:03		Aceito
Declaração de Pesquisadores	delegacaodefunes.pdf	29/01/2019 16:24:32	Giovana Bristot	Aceito
Orçamento	Orcamento.pdf	17/12/2018 14:56:58	Marcia Kauer SantAnna	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	TCUMB.pdf	17/12/2018 14:56:35	Marcia Kauer SantAnna	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	17/12/2018 14:49:25	Marcia Kauer SantAnna	Aceito
Cronograma	Cronograma.pdf	17/12/2018 14:49:05	Marcia Kauer SantAnna	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoDetalhado.pdf	17/12/2018 14:48:46	Marcia Kauer SantAnna	Aceito
Folha de Rosto	Folhaderosto.pdf	17/12/2018 14:29:20	Marcia Kauer SantAnna	Aceito

Situação do Parecer:

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229

Bairro: Santa Cecília

CEP: 90.035-903

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3359-7640

Fax: (51)3359-7640

E-mail: cep@hcpa.edu.br

UFRGS - HOSPITAL DE
CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
DA UNIVERSIDADE FEDERAL



Continuação do Parecer: 3.166.894

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PORTO ALEGRE, 25 de Fevereiro de 2019

Assinado por:
Marcia Mocellin Raymundo
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229

Bairro: Santa Cecília

CEP: 90.035-903

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3359-7640

Fax: (51)3359-7640

E-mail: cep@hcpa.edu.br

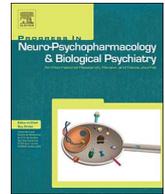
ANEXO B: Artigos científicos publicados em autoria ou coautoria durante o período do doutorado, os quais não estão relacionados diretamente à tese.

Para fins práticos, consta apenas a primeira página de cada uma destas publicações.



Contents lists available at ScienceDirect

Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/pnp

Clinical staging and serum cytokines in bipolar patients during euthymia



Amparo Tatay-Manteiga^a, Vicent Balanzá-Martínez^{b,c}, Giovana Bristot^{d,e},
Rafael Tabarés-Seisdedos^b, Flavio Kapczinski^f, Omar Cauli^{g,*}

^a Service of Psychiatry, University General Hospital, Valencia, Spain

^b Teaching Unit of Psychiatry and Psychological Medicine, Department of Medicine, University of Valencia, CIBERSAM, Valencia, Spain

^c Service of Psychiatry, La Fe University and Polytechnic Hospital, Valencia, Spain

^d Laboratório de Psiquiatria Molecular, Centro de Pesquisas Experimentais, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia – Medicina Translacional (INCT-TM), Porto Alegre, RS, Brazil

^e Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

^f McMaster University, Hamilton, Canada

^g Department of Nursing, University of Valencia, Valencia, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Bipolar disorder
Cytokines
Inflammation
Neurotrophins
Leukocytes
Clinical staging

ABSTRACT

Aims: Changes in serum cytokines and altered neutrophin concentration have been associated with bipolar disorder (BD). Our aim here was to analyze peripheral blood biomarkers according to the clinical stages of BD.

Method: Euthymic BD-I patients were grouped according to their level of functioning in early-stage (n = 25) and late-stage (n = 23), and compared to healthy siblings (n = 23) and genetically unrelated healthy controls (n = 21). Neurotrophin (neurotrophin-3 and BDNF) concentration and biomarkers of inflammation, including cytokines (IL-6, IL-10 and TNF- α), leukocytes count and acute phase proteins, were measured.

Results: IL-10 concentration was significantly increased in early-stage patients compared to late-stage patients, healthy siblings and controls whereas TNF- α concentration was significantly increased in late-stage patients compared to controls. Total leukocytes, neutrophil and monocyte count were significantly increased in late-stage patients compared to healthy siblings and controls. The concentration of IL-6, neurotrophin-3 and BDNF was unchanged in euthymia. Healthy siblings did not show significant changes in any biomarker.

Conclusions: The concentration of IL-10, TNF- α , neutrophil and monocytes subtype count in blood is altered in patients with BD during euthymic state. The link between peripheral inflammation and different stages in BD deserves further studies.

1. Introduction

Bipolar disorder (BD) is a severe, chronic mood disorder characterized by recurrent episodes of depression and (hypo)mania, interspersed with periods of clinical remission or euthymia. BD is associated with an important global disability as well as increased morbidity and mortality (Soreca et al., 2009; Vieta et al., 2013). Several clinical staging systems have been proposed to classify BD patients into different stages of the disease, taking into account clinical, neurocognitive and functional variables as well as peripheral biomarkers (Berk et al., 2007; Kapczinski et al., 2009, 2014).

It has been postulated that the pathophysiology of BD could be understood as a progressive process in which the action of certain exogenous agents can produce small changes in the structures of the central nervous system (CNS) that could alter the course of the disease (Post, 1992, 2007b). The molecular mediators associated with these

changes include genes, neurotrophic factors, hormones, the inflammatory/immune system and oxidative/nitrosidative stress (Vieta et al., 1999; McEwen and Wingfield, 2003; Caspi and Moffitt, 2006; Berk et al., 2007, 2011; Schloesser et al., 2008; Leboyer et al., 2012; Gama et al., 2013; Goldstein and Young, 2013; Rege and Hodgkinson, 2013; Barbosa et al., 2014a).

Notably, most of the studies on peripheral biomarkers in BD have focused on depression and/or mania and have consistently shown increased concentrations of pro-inflammatory cytokines, such as TNF- α (O'Brien et al., 2006; Brietzke et al., 2009; Kauer-Sant'Anna et al., 2009; Hope et al., 2011; Ortiz-Dominguez et al., 2007; Barbosa et al., 2011, 2012b; Munkholm et al., 2013; Modabbernia et al., 2013) and IL-6 (O'Brien et al., 2006; Kauer-Sant'Anna et al., 2009; Brietzke et al., 2009; Hope et al., 2011, Modabbernia et al., 2013) in BD patients. Moreover, several reports have shown that cytokine concentrations return to normal values after resolution of acute episodes (Munkholm

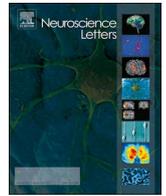
* Corresponding author at: University of Valencia, c/Jaume Roig s/n, 46010, Valencia, Spain.
E-mail address: Omar.Cauli@uv.es (O. Cauli).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.pnpbp.2017.04.028>

Received 11 February 2017; Received in revised form 11 April 2017; Accepted 21 April 2017

Available online 23 April 2017

0278-5846/ © 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.



Research article

Leptin levels and its correlation with crack-cocaine use severity: A preliminary study

Mariana Escobar^{a,b,*}, Juliana Nichterwitz Scherer^a, Felipe Ornell^a, Giovana Bristot^{c,d}, Cassia Medino Soares^b, Luciano Santos Pinto Guimarães^b, Lísia Von Diemen^{a,b}, Flavio Pechansky^{a,b}

^a Center for Drug and Alcohol Research, Hospital de Clínicas of Porto Alegre, Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil

^b Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil

^c Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

^d Bipolar Disorder Program, Laboratory of Molecular Psychiatry, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Crack cocaine
Leptin
Biomarkers
Drug severity
Brain reward system

ABSTRACT

Background: Crack-cocaine is an important public health problem in Brazil and worldwide. It is a potent form of cocaine which results in rapid and damaging stimulating effects on the central nervous system through inhibition of the dopamine transporter. Some studies have suggested that both food and drugs – including crack, can act on the same brain reward mechanisms, altering the dopamine pathways that modulate behavioral responses. Our hypothesis was that leptin, a well-known peptide that modulates energy metabolism and appetite, can be used as a biomarker for drug use.

Methods: Anthropometric data, drug use profiles, and leptin serum levels were evaluated in a cross-sectional study of 40 crack-cocaine users.

Results: Leptin showed an inverse correlation with the severity of crack use, and this correlation remained when corrected by body mass index (BMI) and body composition by bioimpedance (BIA). The majority of subjects were eutrophic or overweight/obese considering BMI and BIA, and these variables were not significantly associated with the severity of crack use, but positively correlated with leptin levels.

Conclusions: Our preliminary findings suggest that leptin could be involved in drug use severity, perhaps through pathways similar to those whereby it modulates food intake. Considering the anthropometric parameters, these findings provide additional evidence that low weight is not predominant in crack users.

1. Introduction

Crack-cocaine (crack) addiction is an important public health problem in Brazil and worldwide. Crack is a potent smoked form of cocaine, which results in rapid and damaging stimulating effects on the central nervous system by blocking the re-uptake of monoamine neurotransmitters (e.g. dopamine, serotonin, and norepinephrine), producing high levels of these neurotransmitters at postsynaptic receptors [15,20]. Identification of biomarkers may be useful in untangling neurobiological processes involved in drug abuse for both clinical and research purposes [22].

Jeynes and Gibson [9], in a recent narrative review assessing the relationship between substance use disorders and nutrition, noted the demand for detailed nutritional assessment to determine specific micronutrient needs, and found evidence of overlaps in brain chemical

reward signaling between drug addictions and eating, suggesting a link between food restriction, satiety signaling, and substance abuse. Malnutrition in this population may be multifactorial, and the drug itself may act as an appetite suppressant, reducing body weight with its anorexic effects. On the other hand, weight gain and binge eating have been observed in recovering addicts [4,21]. Surprisingly, a pilot study conducted by our group showed high rates of crack users with normal weight and overweight at hospital admission [27].

Volkow et al. [23] suggested the possibility that food and drugs, such as crack, may act on the aforementioned brain reward mechanisms (i.e., disruption of dopamine pathways that modulate behavioral responses). Therefore, it is not surprising that neurotransmitters implicated in food intake would also be implicated in drug-seeking behaviors. In this line of thought, peptides that regulate food intake—such as leptin—could also influence drug-reinforcing effects. Leptin is an

* Corresponding author at: Center for Drug and Alcohol Research, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Alvaro Alvim Unit, Rua Prof. Alvaro Alvim, 400, CEP 90420-020, Porto Alegre, Brazil.

E-mail address: mariescobar@hcpa.edu.br (M. Escobar).

<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.02.009>

Received 4 December 2017; Received in revised form 18 January 2018; Accepted 5 February 2018

Available online 05 February 2018

0304-3940/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.



Oxidative stress markers imbalance in late-life depression

Breno S. Diniz^{a,b,*}, Ana Paula Mendes-Silva^b, Lucelia Barroso Silva^b, Laiss Bertola^b,
Monica Costa Vieira^b, Jessica Diniz Ferreira^b, Mariana Nicolau^b, Giovana Bristot^{c,d},
Eduarda Dias da Rosa^{c,d}, Antonio L. Teixeira^a, Flavio Kapczinski^e

^a Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, McGovern Medical School, The University of Texas Health Science Center at Houston, Houston, TX, USA

^b Graduate Program of Molecular Medicine, School of Medicine, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

^c Department of Biochemistry, Institute of Health and Basic Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

^d Laboratory of Molecular Psychiatry, Experimental Research Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, RS, Brazil

^e Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, McMaster University, Hamilton, Canada

ARTICLE INFO

Keywords:

Late-life depression
Oxidative stress
Lipid peroxidation
Cognitive impairment
Elderly

ABSTRACT

Background: Oxidative stress has been implicated in the pathophysiology of mood disorders in young adults. However, there is few data to support its role in the elderly. The primary aim of this study was to evaluate whether subjects with late-life depression (LLD) presented with changes in oxidative stress response in comparison with the non-depressed control group. We then explored how oxidative stress markers associated with specific features of LLD, in particular cognitive performance and age of onset of major depressive disorder in these individuals.

Methods: We included a convenience sample of 124 individuals, 77 with LLD and 47 non-depressed subjects (Controls). We measure the plasma levels of 6 oxidative stress markers: thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), protein carbonyl content (PCC), free 8-isoprostane, glutathione peroxidase (GPx) activity, glutathione reductase (GR) activity, and glutathione S-transferase (GST) activity.

Results: We found that participants with LLD had significantly higher free 8-isoprostane levels ($p = 0.003$) and lower glutathione peroxidase activity ($p = 0.006$) compared to controls. Free 8-isoprostane levels were also significantly correlated with worse scores in the initiation/perseverance ($r = -0.24$, $p = 0.01$), conceptualization ($r = -0.22$, $p = 0.02$) sub-scores, and the total scores ($r = -0.21$, $p = 0.04$) on the DRS.

Conclusions: Our study provides robust evidence of the imbalance between oxidative stress damage, in particular lipid peroxidation, and anti-oxidative defenses as a mechanism related to LLD, and cognitive impairment in this population. Interventions aiming to reduce oxidative stress damage can have a potential neuroprotective effect for LLD subjects.

1. Introduction

Oxidative stress can be defined as a disturbance in pro-oxidant–antioxidant balance in favor of the former, leading to potential cellular and tissue damage (Valko et al., 2007). Free radicals and other so-called ‘reactive species’ are constantly produced in vivo by all body tissues, mainly during oxidative phosphorylation in the mitochondrial matrix (Adam-Vizi and Chinopoulos, 2006). Under physiological circumstances, reactive oxygen species (ROS) are eliminated by cellular enzymatic and non-enzymatic antioxidant mechanisms. However, under pathological circumstances, there is a shift towards a pro-oxidative state due to the increase in pro-oxidation markers, reduction in antioxidant mechanisms, or both. The persistent increase in oxidative

stress can lead to cellular and tissue damage that can manifest in different ways, including lipid peroxidation, protein and DNA damage.

Increased oxidative stress is a major driving of the aging process and is involved in the pathophysiology of several neuropsychiatric disorders across lifespan (Joshi and Praticò, 2014). Several studies have investigated whether mood disorders in young and middle-aged adults were associated with changes in oxidative stress markers. Patients with bipolar disorder, regardless of symptomatic phase or euthymia, and with major depressive disorder consistently show higher levels of oxidative stress markers (e.g. TBARS, 8-OH-DNA, protein carbonyl content) and lower levels of antioxidants (e.g. glutathione peroxidase, glutathione transferase) (Andreazza et al., 2009, 2007; Black et al., 2015; Magalhães et al., 2012; Soeiro-de-Souza et al., 2013). Of

* Corresponding author. Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, McGovern Medical School, The University of Texas Health Science Center at Houston, 2800 South MacGregor Way, Houston, TX, 77021, USA.

E-mail addresses: breno.satlerdeoliveiradiniz@uth.tmc.edu, brenosatler@gmail.com (B.S. Diniz).

<https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2018.02.023>

Received 7 December 2017; Received in revised form 29 January 2018; Accepted 22 February 2018

0022-3956/ © 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

ORIGINAL ARTICLE

Effects of lithium on inflammatory and neurotrophic factors after an immune challenge in a lisdexamfetamine animal model of mania

Giovana Bristot,^{1,2}  Bruna M. Ascoli,^{1,3} Ellen Scotton,^{1,3} Luiza P. Géa,^{1,4} Bianca Pfaffenseller,¹ Márcia Kauer-Sant'Anna^{1,2,3} 

¹Laboratório de Psiquiatria Molecular, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil. ²Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil. ³Programa de Pós-Graduação em Psiquiatria e Ciências do Comportamento, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil. ⁴Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Terapêutica, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil.

Objective: To evaluate whether an animal model of mania induced by lisdexamfetamine dimesylate (LDX) has an inflammatory profile and whether immune activation by lipopolysaccharides (LPS) has a cumulative effect on subsequent stimuli in this model. We also evaluated the action of lithium (Li) on inflammatory and neurotrophic factors.

Methods: Adult male Wistar rats were subjected to an animal model of mania. After the open-field test, they were given LPS to induce systemic immune activation. Subsequently, the animals' blood was collected, and their serum levels of brain-derived neurotrophic factor and inflammatory markers (tumor necrosis factor [TNF]- α , interleukin [IL]-6, IL-1 β , IL-10, and inducible nitric oxide synthase [iNOS]) were measured.

Results: LDX induced hyperactivity in the animals, but no inflammatory marker levels increased except brain-derived neurotrophic factor (BDNF). Li had no effect on serum BDNF levels but prevented iNOS levels from increasing in animals subjected to immune activation.

Conclusion: Although Li prevented an LPS-induced increase in serum iNOS levels, its potential anti-inflammatory effects in this animal model of mania were conflicting.

Keywords: Bipolar disorder; mania; lithium; inflammation; lisdexamfetamine dimesylate

Introduction

Bipolar disorder is a severe psychiatric disorder affecting 1-4% of the population.¹ Bipolar disorder is also associated with high rates of medical comorbidities,² such as autoimmune disorders, cardiovascular disease, and metabolic dysfunction.³ The connection between bipolar disorder and these comorbidities seems to involve multiple biological pathways, among which inflammation stands out as a pivotal pathophysiological mechanism.

A recent study by Leboyer et al. suggested that low-grade inflammation may be present in bipolar patients, based on alterations in peripheral and central inflammatory markers, which could be associated with damage to the central nervous system (CNS).⁴ A meta-analysis of 30 studies found that pro-inflammatory, anti-inflammatory, and regulatory cytokines are activated in bipolar disorder, although their precise role in the pathophysiology of this mental disorder remains unknown.⁵ Inducible nitric oxide synthase (iNOS) is involved in the production of a great

amount of nitric oxide (NO) for sustained periods of time and has been linked to inflammation and the potential damaging actions of NO. In a study by Savas et al., higher plasma NO levels were found in bipolar patients than healthy subjects.⁶

Lithium (Li), the gold standard treatment for bipolar disorder, has been implicated in immune system modulation since the pioneering work of Horrobin & Lieb in the early 1980s.⁷ Since then, the effects of Li on inflammation have been investigated in a number of studies. One of them found fewer cytokine-secreting cells (interleukin [IL]-6, IL-10, IL-2, and interferon [IFN]- γ) in bipolar patients after chronic Li treatment, suggesting that Li may normalize immune activation.⁸

In addition to its effects on inflammation, Li acts on other biological pathways related to oxidative stress and neurotrophins,⁹ probably helping to delay illness progression. Neurotrophins are essential for CNS development and maintenance. Among them is the brain-derived neurotrophic factor (BDNF), which is widely distributed in the

Correspondence: Márcia Kauer-Sant'Anna, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Centro de Pesquisa Experimental, Laboratório de Psiquiatria Molecular, Rua Ramiro Barcelos, 2350, CEP 90035-903, Porto Alegre, RS, Brazil.

E-mail: mksantanna@gmail.com

Submitted Dec 13 2017, accepted Sep 28 2018, Epub Mar 07 2019.

How to cite this article: Bristot G, Ascoli BM, Scotton E, Géa LP, Pfaffenseller B, Kauer-Sant'Anna M. Effects of lithium on inflammatory and neurotrophic factors after an immune challenge in a lisdexamfetamine animal model of mania. Braz J Psychiatry. 2019;41:419-427. <http://dx.doi.org/10.1590/1516-4446-2017-0001>

RESEARCH

Open Access



Attenuated inflammatory response of monocyte-derived macrophage from patients with BD: a preliminary report

Bruna M. Ascoli^{1,2†}, Mariana M. Parisi^{3,4‡}, Giovana Bristot^{1,4}, Bárbara Antqueviezc¹, Luiza P. Géa^{1,5}, Rafael Colombo⁶, Flávio Kapczinski^{2,7,8}, Fátima Theresinha Costa Rodrigues Guma^{4,9}, Elisa Brietzke¹⁰, Florencia M. Barbé-Tuana^{3,11†} and Adriane R. Rosa^{1,2,5*†} 

Abstract

Background: Innate immune system dysfunction has been recognized as an important element in the pathophysiology of bipolar disorder (BD). We aimed to investigate whether there are differences in the response of macrophages derived from patients in the early stages and late stages of BD and healthy subjects.

Methods: Human monocytes purified from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of patients with BD type I (n = 18)—further classified into early- and late stage BD patients according to their functioning- and from healthy individuals (n = 10) were differentiated into macrophages in vitro. Monocyte-derived macrophages (M) were exposed to IFN γ plus LPS-M(IFN γ + LPS)- or IL-4-M(IL-4)—to induce their polarization into the classical (also called M1) or alternative (also called M2) activation phenotypes, respectively; or either M ψ were not exposed to any stimuli characterizing the resting state (denominated M0). In vitro secretion of cytokines, such as IL-1 β , IL-6, IL-10, and TNF- α , was used as an index of macrophage activity.

Results: M(IFN γ + LPS) from late-stage BD patients produced less amount of IL-1 β , IL-6, and IL-10 when compared to early-stage BD patients and healthy controls. Following alternative activation, M(IL-4) derived from late-stage patients secreted less IL-6 compared to the other groups. TNF α was less secreted by all macrophage phenotypes derived from late-stage patients when compared to healthy controls only ($p < 0.005$). M ψ from late-stage patients exhibited lower production of IL-1 β and IL-10 compared to macrophages from healthy subjects and early-stage patients respectively. Interestingly, cytokines secretion from M(IFN γ + LPS), M(IL-4) and M ψ were similar between early-stage patients and healthy controls.

Conclusion: Our results suggest a progressive dysfunction in the response of peripheral innate immune cells of BD patients in the late stages of the illness. This failure in the regulation of the immune system function may be implicated in the multisystemic progression of BD.

Keywords: Bipolar disorder, Mood disorders, Inflammatory cytokines, Macrophage polarization, Macrophage dysfunction

*Correspondence: adrianerrosa@gmail.com

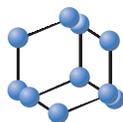
†Florencia M. Barbé-Tuana and Adriane R. Rosa share the senior authorship

‡Bruna M. Ascoli and Mariana M. Parisi have joint contribution

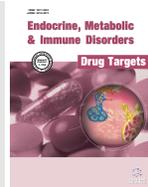
¹ Laboratory of Molecular Psychiatry, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Rua Ramiro Barcelos, 2350, Porto Alegre, RS, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article

RESEARCH ARTICLE

BENTHAM
SCIENCE

Peripheral Oxidative Stress Markers in Patients with Bipolar Disorder during Euthymia and in Siblings



Amparo Tatay-Manteiga¹, Vicent Balanzá-Martínez², Giovana Bristot^{3,4}, Rafael Tabarés-Seisdedos², Flavio Kapczinski⁵ and Omar Cauli^{6,*}

¹Service of Psychiatry, University General Hospital, Valencia, Spain; ²Teaching Unit of Psychiatry and Psychological Medicine, Department of Medicine, University of Valencia, CIBERSAM, Valencia, Spain; ³Laboratório de Psiquiatria Molecular, Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, RS, Brazil; ⁴Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil; ⁵Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, McMaster University, Hamilton, Canada; ⁶Department of Nursing, University of Valencia, Valencia, Spain

Abstract: Aims: Oxidative stress is increased during the acute phases of bipolar disorder (BD). Our aim here was to analyze oxidative stress biomarkers in patients with BD during euthymia and their siblings.

Method: A cross-sectional study was performed in euthymic patients with BD-I (n=48), unaffected siblings (n=23) and genetically unrelated healthy controls (n=21). Protein carbonyl content (PCC), total antioxidant capacity (TRAP), lipid peroxidation (TBARS) and uric acid were measured as biomarkers of oxidative stress in blood.

Results: The antioxidant capacity (TRAP) was lower (p<0.001) in patients with BD compared to their siblings and controls, whereas no differences were observed in PCC, TBARS or uric acid. In patients, the concentrations of TRAP and TBARS were positively associated with the dose of valproic acid (p<0.05 and p<0.001, respectively). The concentrations of these biomarkers were not significantly associated with any of socio-demographic and clinical variables.

Conclusion: A selective reduction in antioxidant capacity is present in BD during euthymia state, whereas other markers of oxidative stress are unaltered during euthymia. Siblings did not show any alterations in oxidative stress biomarkers. Oxidative stress might represent a state-dependent marker in BD. The association between treatment with valproic acid and oxidative stress markers in euthymia deserves further studies.

ARTICLE HISTORY

Received: December 28, 2018
Revised: February 19, 2019
Accepted: February 27, 2019

DOI:
10.2174/1871530319666190307165355



CrossMark

Keywords: Bipolar disorder, oxidative stress, euthymia, anti-oxidants, biomarker, valproic acid, benzodiazepines.

1. INTRODUCTION

Bipolar disorder (BD) is a chronic mood disorder associated with an important global disability and increased morbidity [1, 2]. It has been postulated that the pathophysiology of BD could be understood as a progressive process in which the action of certain exogenous agents can produce small changes in the structures of the central nervous system (CNS) that could alter the course of the disease [3-5]. Several molecular mediators had been shown to be altered in the blood of patients with BD including genes, neurotrophic factors, hormones, the inflammatory/immune system and oxidative stress species [6-15].

Oxidative damage occurs when reactive oxygen species (ROS) interact with lipids, proteins or nucleic acids. ROS-mediated is a mechanism of cellular injury in a number of

conditions, including cancer, inflammatory states, and neurodegeneration [16]. Evidence of oxidative damage has been consistently shown in mood episodes [17-19] and may also help link the accelerated aging, functional impairment, cognitive dysfunction, and premature mortality seen in BD [20-23].

During the acute phases (mania or depression) of BD, oxidative stress has been suggested as one of the major molecular alterations linked to the pathophysiology of BD [24-29, 18] because it may promote DNA oxidation [30] and mitochondrial dysfunction [31, 32]. Both molecular events, DNA damage and mitochondrial dysfunction have been reported in patients with BD [25, 33-37].

In contrast, during euthymia, no alterations have been found in some biomarkers of oxidative stress such as the activity of the antioxidant enzyme, superoxide dismutase (SOD) [24, 26, 38] or the concentration of the thiobarbituric acid substances (TBARS), a marker of lipid peroxidation [39-41].

*Address correspondence to this author at the Department of Nursing, University of Valencia, Valencia, Spain; E-mail: Omar.Cauli@uv.es



BDNF prevents central oxidative damage in a chronic unpredictable mild stress model: The possible role of PRDX-1 in anhedonic behavior

Ellen Scotton^{a,b}, Rafael Colombo^{a,c}, Jéssica C. Reis^a, Gabriela M.P. Possebon^a, Gabriel H. Hizo^a, Fernanda E. Valiati^{a,d}, Luiza P. Géa^{a,e}, Giovana Bristot^{a,d}, Mirian Salvador^f, Tuani M. Silva^f, Alessandra E. Guerra^g, Tiago F. Lopes^h, Adriane R. Rosa^{a,b,e}, Maurício Kunz^{a,b,*}

^a Laboratório de Psiquiatria Molecular, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

^b Programa de Pós-Graduação em Psiquiatria e Ciências do Comportamento, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

^c Universidade de Caxias do Sul (UCS), Caxias do Sul, RS, Brazil

^d Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil

^e Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Terapêutica, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil

^f Laboratório de estresse oxidativo e antioxidantes, Instituto de Biotecnologia, UCS, Caxias do Sul, RS, Brazil

^g Easy Search Assessoria em Pesquisa, Grupo Diagnose, Caxias do Sul, RS, Brazil

^h Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Major depressive disorder
Anhedonic behavior
Chronic unpredictable mild stress
BDNF
Oxidative stress
Proteomics

ABSTRACT

Prolonged activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis and sustained increase of glucocorticoids have been evidenced in major depression and are related to changes involving neurotrophins and markers of oxidative stress in response to inflammation. This study aimed to evaluate central measures of brain-derived neurotrophic factor (BDNF), oxidative damage and total antioxidant capacity in rats submitted to chronic unpredictable mild stress (CUMS), as well as to investigate the relationship between BDNF levels and differentially expressed processes. For this purpose, male Wistar rats were submitted to CUMS for six weeks. Based on a sucrose preference test (SPT), the animals were divided into anhedonic or non-anhedonic clusters. Afterwards, forced swim test (FST) and open field test (OFT) were performed, and the animals were euthanized. Brain tissue was collected, followed by quantification of oxidative damage, total antioxidant capacity and BDNF levels. Anhedonic behavior was evidenced in stress-susceptible animals through decreased sucrose preference. No differences were found in FST or OFT results. We observed increased BDNF levels in the hippocampus (HPC) of animals exposed to the CUMS protocol, accompanied by decreased total antioxidant capacity, despite the absence of oxidative damage to lipids and proteins. Moreover, we used a bioinformatics approach to identify proteins involved in oxidative stress and inflammation pathways, which were differentially expressed in anhedonic animals from other studies with similar experimental protocol. Expressed proteins (DEP) involved in oxidative stress and inflammatory biological Anhedonic behavior was associated with peroxiredoxin-1 (PRDX-1) up-regulation and down-regulation of proteins involved with apoptotic and inflammation signaling (RELA, ASK-1 and TAK-1) in the HPC. Taken together, these data suggest that BDNF and PRDX-1 might be involved in initial stress response, playing a compensatory role by preventing oxidative damage to lipids and proteins through the modulation of antioxidant defense after CUMS in anhedonic animals.

1. Introduction

Major depressive disorder (MDD) is a severe, chronic, highly disabling psychiatric disorder often associated with comorbidities, as well

as a high risk of suicide [1–3]. Anhedonia is a clinical hallmark of MDD, which is characterized by a lack of pleasure and loss of reactivity to positive stimuli [4,5]. Individuals with MDD exhibit functional impairment and poor quality of life, which are important outcomes for

* Corresponding author at: Department of Psychiatry, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

E-mail addresses: ellensc7@hotmail.com (E. Scotton), rcolombo1@ucs.br (R. Colombo), reis.jessica96@gmail.com (J.C. Reis), gabriellapossebon@gmail.com (G.M.P. Possebon), gh231483@gmail.com (G.H. Hizo), f.e.valiati@gmail.com (F.E. Valiati), lupgea@gmail.com (L.P. Géa), giubristot@gmail.com (G. Bristot), msalvado@ucs.br (M. Salvador), tuanimendes@yahoo.com.br (T.M. Silva), aeggodoy@gmail.com (A.E. Guerra), tflopes@hcpa.edu.br (T.F. Lopes), adrianerrosa@gmail.com (A.R. Rosa), maukunz@gmail.com (M. Kunz).

<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.112245>

Received 14 March 2019; Received in revised form 4 September 2019; Accepted 16 September 2019

Available online 17 September 2019

0166-4328/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

Gender dysphoria: prejudice from childhood to adulthood, but no impact on inflammation. A cross-sectional controlled study

André Gonzales Real,^{1,2} Anna Martha Vaites Fontanari,^{1,2} Angelo Brandelli Costa,³
Bianca Machado Borba Soll,^{1,2} Giovana Bristot,^{4,5} Larissa Fagundes de Oliveira,⁴ Ana Maria Kamphorst,¹
Maiko Abel Schneider,^{1,2} Maria Inês Rodrigues Lobato^{1,2}

Abstract

Introduction: Gender dysphoria (GD) is characterized by a marked incongruence between experienced gender and one's gender assigned at birth. Transsexual individuals present a higher prevalence of psychiatric disorders when compared to non-transsexual populations, and it has been proposed that minority stress, i.e., discrimination or prejudice, has a relevant impact on these outcomes. Transsexuals also show increased chances of having experienced maltreatment during childhood. Interleukin (IL)-1 β , IL-6, IL-10 and tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) are inflammatory cytokines that regulate our immune system. Imbalanced levels in such cytokines are linked to history of childhood maltreatment and psychiatric disorders. We compared differences in IL-1 β , IL-6, IL-10 and TNF- α levels and exposure to traumatic events in childhood and adulthood in individuals with and without GD (DSM-5).

Methods: Cross-sectional controlled study comparing 34 transsexual women and 31 non-transsexual men. They underwent a thorough structured interview, assessing sociodemographic information, mood and anxiety symptoms, childhood maltreatment, explicit discrimination and suicidal ideation. Inflammatory cytokine levels (IL-1 β , IL-6, IL-10 and TNF- α) were measured by multiplex immunoassay.

Results: Individuals with GD experienced more discrimination ($p = 0.002$) and childhood maltreatment ($p = 0.046$) than non-transsexual men. Higher suicidal ideation ($p < 0.001$) and previous suicide attempt ($p = 0.001$) rates were observed in transsexual women. However, no differences were observed in the levels of any cytokine.

Conclusions: These results suggest that transsexual women are more exposed to stressful events from childhood to adulthood than non-transsexual men and that GD *per se* does not play a role in inflammatory markers.

Keywords: Gender dysphoria, childhood maltreatment, discrimination, inflammatory cytokines, transsexuality, case-control study.

¹ Programa de Identidade de Gênero (PROTIG), Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil. ² Programa de Pós-Graduação em Psiquiatria e Ciências do Comportamento, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil. ³ Departamento de Psicologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS, Brazil. ⁴ Laboratório de Psiquiatria Molecular, INCT Translacional em Medicina, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil. ⁵ Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil.

This manuscript was based on an academic dissertation titled "Vivência de traumas na infância e estigma e o impacto de eventos traumáticos na concentração sérica de citocinas inflamatórias em indivíduos portadores de Disforia de Gênero," presented in March 2019 at Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. It was also presented as oral presentation in the 24th Congress of the World Association for Sexual Health in Mexico (2019) and in the 37th Brazilian Congress of Psychiatry in Rio de Janeiro (2019).

Submitted Jan 19 2020, accepted for publication May 04 2020.

Suggested citation: Real AG, Fontanari AMV, Costa AB, Soll BMB, Bristot G, de Oliveira LF, et al. Gender dysphoria: prejudice from childhood to adulthood, but no impact on inflammation. A cross-sectional controlled study. Trends Psychiatry Psychother. 2021;43(1):37-46. <http://dx.doi.org/10.47626/2237-6089-2020-0007>