

RODOLFO BRAGA LADEIRA

**Atividade da enzima GSK-3B em pacientes idosos
portadores de transtorno bipolar medicados**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo,
para obtenção do grau de Mestre em
Ciências

Programa de Psiquiatria

Orientador: Prof. Dr. Orestes Vicente
Forlenza

São Paulo
Julho de 2012

RODOLFO BRAGA LADEIRA

**Atividade da enzima GSK-3B em pacientes idosos
portadores de transtorno bipolar medicados**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo,
para obtenção do grau de Mestre em
Ciências

Programa de Psiquiatria

Orientador: Prof. Dr. Orestes Vicente
Forlenza

São Paulo
Julho de 2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Ladeira, Rodolfo Braga

Atividade da enzima GSK-3B em pacientes idosos portadores de transtorno bipolar medicados / Rodolfo Braga Ladeira. -- São Paulo, 2012.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Psiquiatria.

Orientador: Orestes Vicente Forlenza.

Descritores: 1.Quinase 3 da glicogênio sintase 2.Transtorno bipolar/fisiopatologia
3.Idoso 4.Lítio

USP/FM/DBD-213/12

E a vida segue seu curso:

Do coração das horas,

Parte um ponteiro sem rumo.

Cada segundo, um privilégio,

Singular, em seu sumo.

Dedico este trabalho aos meus pais, que me concederam o privilégio da vida, compartilharam comigo, carinhosamente, seu tempo e apoiaram-me nas escolhas de meu rumo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, **Prof. Dr. Orestes Forlenza**, por acolher-me em sua equipe, por proporcionar-me a oportunidade de realizar este trabalho e de adquirir um saber a ele agregado, bem como às demais atividades exercidas no grupo, ao longo desses anos.

À **Dra. Paula Nunes**, confiar-me os pacientes a ela antes confiados (e que fizeram parte desta pesquisa); por ensinar-me sua forma de cuidado com eles (que eu tanto admiro); e pelo apoio, o incentivo e a disponibilidade em suas colaborações, ainda, por dizer as “palavras certas na hora exata”, aquelas que eu precisava ouvir.

A ambos, minha gratidão por me oferecerem outras oportunidades de experiência acadêmica, durante o período de meu mestrado, como palestras, aulas, participações em congressos, artigos e capítulos de livros.

Aos **amigos e aos colegas do Ipq**, em especial, à **Cláudia Memória** e ao **Ivan Aprahamian**, grandes amigos, que me ajudaram muito a suavizar os momentos de maior dificuldade; À **Jouce Gabriela**, por ajudar-me a organizar a coleta final dos dados nesses últimos meses; À **Aline Sabino** e à **Michelle Ljubetic**, que deram o suporte para manter em funcionamento as atividades nas quais eu me incluo, durante a reta final do mestrado. À **Letícia Paranhos**, por ajudar a minimizar as limitações que a distância BH-SP me impunha. À **Leda Talib** e à **Helena Giroud** por ajudarem com a parte teórica e prática das análises laboratoriais desse trabalho. Agradeço também a Marina Von Zuben, Glenda Dias, Roberta Mirandez, Paula Brum, Giseli Chaves, Sheila Borges, Larissa Biarari, Márcia Radanovic, Martinus van de Bilt, Rodrigo Machado-Vieira, Rafael de Souza, Carolina Prado e a **toda a equipe do LIM-27** pela companhia e apoio ao longo desses anos e pela ajuda que me deram nos momentos em que precisei. Estou certo que, se eu enumerasse todas as pessoas e motivos para agradecer uma a uma, as páginas dessa dissertação seriam insuficientes.

Aos **meus padrinhos**, Paulo e Lucila, por me receberem em São Paulo, no início dessa jornada. E aos **meus amigos** desta cidade e aos de Belo Horizonte, que tornaram minhas idas e vindas mais agradáveis, onde quer que eu estivesse.

Aos meus amigos, **Myrthes Brandão** e **Euler Pereira**, por me ajudarem com a revisão da escrita desta dissertação.

Aos **meus familiares**, que me acompanharam e sempre me incentivaram com entusiasmo e carinho.

Às **secretárias da pós-graduação**, Elisa Fukushima, Isabel Ataíde e Luciana Ferreira, sempre solícitas em prestar informações administrativas.

Ao **estatístico** do IPq, Bernardo dos Santos, por fazer e por ensinar-me a fazer as análises dos dados deste trabalho.

A todos os **idosos** que se dispuseram a participar desta pesquisa.

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (**FAPESP**) e à Associação Beneficente Alzira Denise Hertzog da Silva (**ABAHDS**), pelo apoio financeiro à pesquisa do LIM-27.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (**CNPq**), pela bolsa de mestrado concedida.

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado do *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Júlia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª Ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação: 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Lista de Siglas e Símbolos

RESUMO

SUMMARY

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Aspectos clínicos e epidemiológicos do transtorno bipolar no idoso.....	2
1.2. A enzima glicogênio sintase quinase-3 beta.....	3
1.3. Atividade da GSK-3B nos transtornos psiquiátricos.....	5
2. OBJETIVOS.....	10
3. HIPÓTESES.....	12
4. MÉTODOS.....	14
4.1. Desenho.....	15
4.2. Contexto.....	15
4.3. Amostra.....	15
4.4. Critérios de inclusão.....	15
4.4.1. Pacientes com Transtorno Afetivo Bipolar.....	16
4.4.2. Idosos saudáveis (grupo controle).....	16
4.5. Critérios de exclusão.....	16
4.6. Avaliação do estado mental.....	17

4.6.1. Classificação do transtorno bipolar.....	18
4.6.1.1. Classificação do episódio atual.....	18
4.6.1.2. Classificação de acordo com a idade de início do transtorno.....	18
4.7. Avaliação cognitiva e funcional.....	19
4.8. Procedimentos laboratoriais.....	19
4.8.1. Coleta de sangue e preparo de plaquetas.....	19
4.8.2. Expressão de GSK-3B em plaquetas	20
4.8.3. Determinação indireta da atividade enzimática.....	21
4.9. Análise dos dados.....	22
4.10. Aspectos éticos.....	23
5. RESULTADOS.....	24
5.1. Descrição da amostra.....	25
5.2. Expressão total da GSK-3B, sua fração fosforilada no resíduo de serina-9 e razão da GSK-3B em plaquetas de pacientes com TB e em controles.....	28
5.3. Análise exploratória da influência de variáveis clínicas.....	33
5.4. Análise exploratória de correlações com variáveis clínicas.....	42
6. DISCUSSÃO.....	43
6.1. Limitações.....	47
7. CONCLUSÕES.....	49
8. ANEXOS.....	51
9. REFERÊNCIAS	57

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Distribuição das concentrações de GSK-3B total, fosfo-GSK-3B e razão da GSK-3B, em plaquetas da amostra total.....	28

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Características demográficas e desempenho cognitivo.....	25
Tabela 2. Variáveis relacionadas ao tratamento e curso do quadro clínico dos pacientes com TB.....	27
Tabela 3. Concentrações médias da GSK-3B total e fosfo-GSK-3B (em pg/ml) e razão da GSK-3B nos pacientes com TB e controles.....	30
Tabela 4. Associação entre diagnóstico, idade e CAMCOG e a variável dependente fosfo-GSK-3B pela regressão linear, utilizando-se o método “Backward”	31
Tabela 5. Associação entre diagnóstico, idade e CAMCOG e a variável dependente razão da GSK-3B pela regressão linear, utilizando-se o método “Backward”	32
Tabela 6. Concentrações médias da GSK-3B total e fosfo-GSK-3B (em pg/ml) e razão da GSK-3B em plaquetas de pacientes com TB, segundo o diagnóstico cognitivo (com demência ou sem demência) e em controles.....	33
Tabela 7. Concentrações médias da GSK-3B total e fosfo-GSK-3B (em pg/ml) e razão da GSK-3B em plaquetas de pacientes com TB, de acordo com o subtipo clínico (tipo I ou tipo II) e em controles.....	34
Tabela 8. Concentrações médias da GSK-3B total e fosfo-GSK-3B (em pg/ml) e razão da GSK-3B em plaquetas de pacientes com TB, de acordo com o estado afetivo atual (fase ou eutimia) e em controles.....	34
Tabela 9. Concentrações médias da GSK-3B total e fosfo-GSK-3B (em pg/ml) e razão da GSK-3B em plaquetas de pacientes com TB, de acordo com o estado afetivo atual (episódio depressivo ou eutimia) e em controles.....	35
Tabela 10. Concentrações médias da GSK-3B total e fosfo-GSK-3B (em pg/ml) e razão da GSK-3B em plaquetas de pacientes com TB, de acordo com o histórico de internação psiquiátrica e em controles.....	36

Tabela 11. Concentrações médias da GSK-3B total e fosfo-GSK-3B (em pg/ml) e razão da GSK-3B em plaquetas de pacientes com TB, de acordo com a polaridade do primeiro episódio afetivo (mania ou depressão) e em controles.....	37
Tabela 12. Concentrações médias da GSK-3B total e fosfo-GSK-3B (em pg/ml) e razão da GSK-3B em plaquetas de pacientes com TB, de acordo com o uso de lítio e em controles.....	37
Tabela 13. Concentrações médias da GSK-3B total e fosfo-GSK-3B (em pg/ml) e razão da GSK-3B em plaquetas de pacientes com TB, de acordo com o uso de antidepressivos e em controles.....	38
Tabela 14. Concentrações médias da GSK-3B total e fosfo-GSK-3B (em pg/ml) e razão da GSK-3B em plaquetas de pacientes com TB, de acordo com o uso de anticonvulsivantes e em controles.....	39
Tabela 15. Concentrações médias da GSK-3B total e fosfo-GSK-3B (em pg/ml) e razão da GSK-3B em plaquetas de pacientes com TB, de acordo com o uso de antipsicóticos e em controles.....	40
Tabela 16. Concentrações médias da GSK-3B total e fosfo-GSK-3B (em pg/ml) e razão da GSK-3B em plaquetas de pacientes com TB, de acordo com o uso de benzodiazepínicos e em controles.....	41
Tabela 17. Correlações (ρ de Spearman) das concentrações plaquetárias de GSK-3B (total e fosforilada) e razão da GSK-3B com a litemia, idade de início dos sintomas do TB, tempo de doença, ou escores na HAM-D, YMRS e CAMCOG de pacientes com TB.....	42

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

ANOVA	Análise de variância
APA	<i>American Psychiatric Association</i>
AMT	<i>Abbreviated Mental Test</i> – Teste Mental Abreviado
CAMDEX	<i>Cambridge Examination for Mental Disorders of the Elderly</i>
CAMCOG	<i>Cambridge Cognitive Test</i>
CIP	Coquetel de Inibidor de Protease
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DSM-IV	<i>Diagnostic and Statistic Manual of Mental Disorders, 4th edition</i>
EIA	<i>Enzyme Immunometric Assay</i> – Ensaio Imunométrico Enzimático
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
fosfo-GSK-3B	GSK-3B fosforilada no resíduo de serina-9
GSK	Glicogênio sintase quinase
GSK-3	Glicogênio sintase quinase-3
GSK-3A	Glicogênio sintase quinase-3 alfa
GSK-3B	Glicogênio sintase quinase-3 beta
HAM-D	Escala de Depressão de Hamilton
IC50	Coeficiente de inibição
LIM 27	Laboratório de Investigações Médicas 27
MEEM	Mini-exame do Estado Mental (MMSE, Folstein et al., 1975)
ml	Mililitros
nm	Nanômetros

nM	Nanomolar
pH	Potencial Hidrogeniônico
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonila
PRP	Plasma Rico em Plaquetas
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation Assay</i>
Ser-9	Serina-9
SCID – I/P	<i>Structured Clinical Interview for DSM-IV Axis I Disorders</i> – Entrevista Clínica Estruturada para o DSM-IV – versão traduzida para o português.
SPSS	<i>Statistical Package for Social Science</i>
TB	Transtorno bipolar
TDR	Teste do Desenho do Relógio
USP	Universidade de São Paulo
YMRS	<i>Young Mania Rating Scale</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
°C	Grau Celsius
μl	Microlitro
η²	Eta quadrado

RESUMO

Ladeira, RB. *Atividade da enzima GSK-3B em pacientes idosos portadores de transtorno bipolar medicados* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2012.

Objetivo: A glicogênio sintase quinase-3 beta (GSK-3B) é uma enzima presente em diversos sistemas biológicos e está envolvida na fisiopatologia de vários transtornos neuropsiquiátricos, incluindo o transtorno bipolar. No entanto, estudos *in vivo* da GSK-3B que envolvam pacientes bipolares são escassos. O objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade da GSK-3B em plaquetas de pacientes idosos com transtorno bipolar em tratamento, em comparação com idosos saudáveis não medicados.

Métodos: Foram obtidas amostras de plaquetas de 63 idosos (transtorno bipolar=31, grupo controle=32). A atividade enzimática foi estimada pela razão entre a expressão da forma fosforilada (inativa) da GSK-3B em relação à expressão de ambas as formas (ativa e inativa) da enzima (GSK-3B total), que fornece uma estimativa inversa da atividade enzimática (um aumento da razão indica menor atividade da GSK-3B). A intensidade dos sintomas foi avaliada pela Escala de Depressão de Hamilton de 21 itens e pela Escala de Mania de Young, e o desempenho cognitivo foi avaliado pelo *Cambridge Cognitive Test* e pelo Mini-Exame do Estado Mental.

Resultados: A forma fosforilada da GSK-3B (fosfo-GSK-3B) e a razão da GSK-3B estavam elevadas em pacientes com transtorno bipolar, quando comparadas aos idosos do grupo controle ($p=0,018$ e $p=0,016$, respectivamente). Na avaliação por subgrupos, observaram-se níveis da fosfo-GSK-3B e da razão da GSK-3B mais elevados nos pacientes com transtorno bipolar em uso de lítio, quando comparados aos controles ($p=0,030$ e $p=0,023$, respectivamente), mas não quando comparados aos pacientes com transtorno bipolar que não usavam lítio. O uso das demais medicações avaliadas (anticonvulsivantes, antipsicóticos, antidepressivos e

benzodiazepínicos) não estava associado a diferenças na fosfo-GSK-3B ou na razão da GSK-3B, quando comparado aos controles.

Conclusões: A atividade da GSK-3B está diminuída no presente grupo de idosos com transtorno bipolar em tratamento medicamentoso. A ausência de um grupo de pacientes com transtorno bipolar não medicado, e a não uniformidade das medicações utilizadas não nos permitem afirmar se essa redução se deve à características da doença bipolar em si ou seria influência dos medicamentos utilizados.

Descritores: Quinase 3 da glicogênio sintase, Transtorno bipolar/fisiopatologia, Idoso, Lítio.

SUMMARY

Ladeira, RB. *GSK-3B activity in elderly patients with bipolar disorder undergoing treatment* [Dissertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2012.

Objective: Glycogen synthase kinase-3 beta (GSK-3B) is an important enzyme present in various biological systems and it is involved in the pathophysiology of many prevalent neuropsychiatric diseases, including bipolar disorder. However, human studies addressing GSK-3B activity *in vivo* are scarce. The aim of the present study was to evaluate GSK-3B activity in platelets of elderly patients with bipolar disorder undergoing clinical treatment as compared to healthy older adults unmedicated.

Methods: Platelets samples were obtained from 63 older adults (bipolar disorder=31, comparison group=32). Enzymatic activity was estimated by means of the ratio between the expression of the phosphorylated (inactive) form of GSK-3B to the expression of both forms (active and inactive) of the enzyme (total GSK-3B), yielding an inverse estimate of enzymatic activity (higher ratio indicating lower GSK-3B activity). The magnitude of mood symptoms was evaluated by the Hamilton Depression Scale and Young Mania Rating Scale, and the cognitive performance was assessed by the Cambridge Cognitive Test and the Mini-Mental State Examination.

Results: The phosphorylated form of GSK-3B (phospho-GSK-3B) and the GSK-3B ratio were elevated in patients with bipolar disorder as compared to healthy controls ($P=.018$ and $P=.016$, respectively). When analyzed by subgroups, phospho-GSK-3B and the GSK-3B ratio were elevated in bipolar patients undergoing lithium treatment as compared to healthy controls ($P=.030$ and $P=.023$, respectively), but not when compared to bipolar patients without lithium treatment. The use of other drugs evaluated (anticonvulsants, antipsychotics, antidepressants and benzodiazepines) was not associated with distinct values of either phospho-GSK-3B or GSK-3B ratio, when compared to controls.

Conclusions: GSK-3B activity is decreased in this group of older adults with bipolar disorder undergoing pharmacological treatment. The absence of a group of unmedicated bipolar patients and the non-uniform pattern of treatment do not allow us to say whether this reduction is due to characteristics of bipolar illness itself or an influence of the therapeutic drugs in use.

Descriptors: Glycogen Synthase Kinase 3, Bipolar Disorder/physiopathology, Aged, Lithium.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos clínicos e epidemiológicos do transtorno bipolar no idoso

O transtorno bipolar (TB) é um transtorno mental crônico, caracterizado por períodos de elevação do humor (episódios maníacos, hipomaníacos ou mistos) que se repetem ou alternam com períodos de depressão (episódios depressivos) (APA, 2000; WHO, 1992). Os primeiros sintomas costumam aparecer entre a segunda e terceira décadas de vida, com seu pico de início entre os 20 e 40 anos, mas, em aproximadamente 8% dos casos podem começar após os 65 anos de idade (Almeida e Fenner, 2002). Embora as taxas de prevalência sejam menores nos idosos, comparados aos adultos (0,1% vs. 1%), a prevalência em idosos aumenta de forma expressiva nos ambientes protegidos, como lares e hospitais onde as taxas podem ser tão altas quanto 10% (Vasudev e Thomas, 2010).

Yassa e colaboradores (1988) propuseram 50 anos como idade de corte para o TB de início tardio. Os pacientes com TB de início tardio tendem a ter uma doença mais branda em relação à gravidade dos sintomas maníacos, mas apresentam mais comorbidades clínicas e neurológicas, especialmente demência e transtornos cerebrovasculares (Himmelhoch et al., 1980; Subramaniam, 2007). Além disso, os pacientes com TB de início tardio têm menor carga familiar de transtornos do humor, em comparação a pacientes com TB de início precoce (Deep e Jeste, 2004).

O TB é heterogêneo, com uma ampla variação de sintomatologia e curso (Ackenheil, 2001). Sua etiopatogenia é complexa e ainda pouco esclarecida, mas com evidências apontando para disfunções nos sistemas de sinalização intracelular, de expressão gênica e neuroproteção, que podem estar associadas a interrupções nos circuitos reguladores do humor, como sistema límbico, estriado e córtex pré-frontal. O que se conhece da fisiopatologia do TB é, em grande parte, consequência do que se conhece da ação dos agentes psicofarmacológicos. Neste processo, está envolvida a interação de múltiplos sistemas, uma vez que a maioria das drogas efetivas

provavelmente não atua sobre um sistema de neurotransmissão particular isoladamente, mas modula o balanço funcional entre os diversos sistemas que interagem (Kapczinski et al., 2004).

1.2 A enzima glicogênio sintase quinase-3 beta

A glicogênio sintase quinase-3 (GSK-3, do inglês *glycogen synthase kinase*) é uma enzima que se encontra presente em vários sistemas biológicos. Recebeu esse nome por sua capacidade de fosforilar e inativar a enzima glicogênio sintase (Embi et al., 1980). Posteriormente, descobriu-se que esta cinase participa de vários processos homeostáticos, regulando funções através da fosforilação de diversos substratos (Jope et al., 2007). A enzima apresenta duas isoformas principais: alfa (GSK-3A, 51KDa) e beta (GSK-3B, 46KDa) que, embora sejam codificadas por dois genes diferentes, compartilham 85% de homologia e são reguladas de forma semelhante (Barry et al., 2003; Fuentealba et al., 2004; Frame et al., 2001, Woodgett, 1990). A atividade da GSK-3 regula-se fundamentalmente pela fosforilação, num processo dependente do balanço entre diversas cinases e fosfatases proteicas. A atividade da GSK-3 também regula-se pela formação de complexos protéicos, por sua distribuição intracelular e pela fosforilação de substratos. A forma ativa da GSK-3 corresponde à sua forma não-fosforilada, sendo inibida pela fosforilação em resíduos de serina-9 (no caso da GSK-3B) ou no resíduo de serina-21 (no caso da GSK-3A) (Klein e Melton, 1996; Doble e Woodgett, 2003).

Um grande número de vias de sinalização converge sobre a GSK-3, destacando-se a via Wnt, a fosfatidilinositol 3-quinase (PI 3-quinase ou PI3K), a proteína quinase A (PKA), e proteína quinase C (PKC) (Machado-Vieira et al., 2010).

A GSK-3B, a mais estudada das isoformas da GSK-3, é mais abundante no sistema nervoso central, e envolve-se na regulação de diversas cascatas bioquímicas dentro e fora do sistema nervoso central (Woodgett, 1990). Dada a ampla distribuição tecidual de GSK-3B e o envolvimento desta cinase em diferentes vias de sinalização celular, a GSK-3B tem sido objeto de estudos em doenças sistêmicas como o diabetes e câncer, processos relacionados à inflamação, além de outros importantes transtornos psiquiátricos (além do TB), tais como depressão, esquizofrenia, e desordens neurodegenerativas, particularmente a doença de Alzheimer (Jope e Roh, 2007; Hye et al., 2005; Dugo et al., 2007; Forlenza et al., 2010).

A GSK-3B envolve-se em diversas funções importantes para a biologia celular e, sobretudo, neuronal, tais como a síntese do glicogênio (Rylatt et al., 1980), transcrição gênica, neuroplasticidade, neurotransmissão, regulação de cascatas de apoptose (morte celular) e do ciclo circadiano (Jope, 2003); estas funções estão implicadas, direta ou indiretamente, na fisiopatologia dos transtornos do humor (Machado-Vieira et al., 2009; Rowe et al., 2007).

A constatação de que o lítio inibe a atividade da GSK-3B, sendo este um possível mecanismo subjacente à sua ação terapêutica, levantou a possibilidade de que um prejuízo da regulação da GSK-3B estaria associado à fisiopatologia dos transtornos do humor (Klein e Melton, 1996). Posteriormente, esta hipótese ganhou sustentação a partir de estudos baseados em diversos modelos neurobiológicos, desde experimentos *in vitro* e em modelos animais, até estudos em tecido cerebral *post-mortem*. Deste modo, a investigação do papel da GSK-3B na fisiopatologia dos transtornos do humor assumiu uma posição de destaque na literatura contemporânea (Jope e Johnson, 2004; Machado-Vieira et al., 2009; Li e Jope, 2010).

1.3 Atividade da GSK-3B nos transtornos psiquiátricos

Desde a constatação dos efeitos inibitórios do lítio sobre a GSK-3B, em 1996 (Klein e Melton, 1996), diversos estudos contribuíram para o fortalecimento da hipótese de que a regulação da GSK-3B pode estar envolvida tanto na fisiopatologia de determinados transtornos neuropsiquiátricos, como nos efeitos terapêuticos dos psicofármacos nessas condições (Jope e Johnson, 2004; Machado-Vieira et al., 2009).

Estudos em modelos animais de depressão demonstraram que comportamento depressivo induzido por trauma cerebral leve associou-se ao aumento da atividade da GSK-3B (Shapira et al., 2007). Outro estudo demonstrou que pacientes deprimidos jovens que suicidaram, tinham atividade da GSK-3B aumentada (Karege et al., 2007). Por outro lado, pacientes com depressão refratária ao tratamento antidepressivo podem responder à terapia de potencialização com lítio, estando esse efeito supostamente ligado à ação inibitória da atividade da GSK-3B. Estes achados apontam para a relevância em potencial da modulação da atividade desta enzima na terapêutica dos quadros depressivos (Bauer et al., 2003). Outra evidência da relevância da atividade da GSK-3B na etiopatogênese da depressão vem de estudos que demonstram que drogas ou intervenções com atividade inibitória da GSK-3B têm atividade antidepressiva em modelos animais (Kaidanovich-Beilin et al., 2004; Roh et al., 2003).

Outra linha de evidência que demonstra a relevância da atividade da GSK-3B na fisiopatologia dos quadros depressivos advém do achado de que a atividade serotoninérgica regula a fosforilação e a desfosforilação do resíduo de serina-9 (ser-9) da GSK-3B, isto é, regula o estado funcional desta enzima. A ativação de receptores 5HT1A aumenta a fosforilação de ser-9 da GSK-3B, diminuindo a sua atividade; já ativação de receptores 5HT2 diminui a fosforilação deste resíduo, aumentando a sua atividade (Li et al., 2004). Isto é, em parte, a atividade da GSK-3B regula-se pelo balanço

entre a atividade serotoninérgica sobre estes dois receptores. Este achado é muito relevante, tendo em vista que a alteração da homeostase normal entre a ativação destes dois receptores está implicada na neurobiologia da depressão (Borsini, 1994; Berendsen et al., 1995). Portanto, alterações nos sistemas serotoninérgicos podem determinar aumento da atividade da GSK-3B, sendo um fator importante na etiopatogênese da depressão (Jope & Roh, 2006).

Algumas linhas de pesquisa investigam a hipótese de que alterações na GSK-3B estariam relacionadas à esquizofrenia, porém, os dados disponíveis são contraditórios: alguns sugerem que a ação da GSK-3B está reduzida, enquanto outros sugerem que está aumentada em associação com a esquizofrenia (Jope et al., 2006). Desta forma, as evidências desta associação são menos robustas do que as encontradas nos transtornos de humor.

No que se refere ao TB, o achado de que o lítio e, com menor consistência na literatura, outras terapias estabilizadoras do humor têm como ação comum a inibição da GSK-3B suportam os postulados de que a inibição dessa enzima contribui para as ações terapêuticas dessas estratégias e que a atividade dessa enzima estaria relacionada com a fisiopatologia do TB.

A GSK-3B foi relacionada ao TB, pela primeira vez, em 1996, pela constatação de que o lítio é um inibidor direto da GSK-3B (Klein e Melton, 1996). Os autores constataram que o lítio inibe a atividade da enzima com um coeficiente de inibição (IC50) de aproximadamente 2 mM, ligeiramente superior ao intervalo de concentrações terapêuticas de lítio no soro, que é aproximadamente 0,5-1,5 mM. Logo depois, estudos mostraram que o lítio inibe a GSK-3, tanto em células intactas (Stambolic et al., 1996) quanto no cérebro de ratos *in vivo* (Munoz-Montano, 1997). Mostraram, ainda, que o efeito inibitório do lítio se deve a uma ação relativamente seletiva para GSK-3, por um mecanismo de competição com o magnésio (Ryves e Harwood, 2001). Posteriormente, descobriu-se que o lítio também inibe a enzima por

mecanismo indireto, em que o efeito anterior (direto) amplifica-se a partir da fosforilação do resíduo de serina-9 da GSK-3B (De Sarno et al., 2002). Um estudo conduzido em nosso grupo avaliou o efeito do lítio sobre a transcrição de GSK-3A e GSK-3B em culturas primárias de neurônios e em tecido cerebral de ratos e demonstrou que o lítio, além de inibir a atividade da enzima, também modula a sua expressão *in vitro* e *in vivo*, inibindo a transcrição de mRNA para a síntese de GSK-3B (Mendes et al., 2008).

Poucos estudos investigaram efeitos de outros agentes utilizados como estabilizadores de humor na regulação da GSK-3B. Embora alguns achados indiquem que outros tratamentos, como o ácido valproico, antipsicóticos, outros anticonvulsivantes utilizados como estabilizadores de humor e a eletroconvulsoterapia possam ter efeito na regulação da GSK-3 ou da isoforma GSK3-B (Roh et al., 2005; Roh et al., 2003; Li et al., 2010), até o momento, poucos estudos foram realizados com essas estratégias terapêuticas, e alguns achados não foram reproduzidos em outros estudos (Machado-Vieira et al., 2010).

A maioria das conclusões sobre a relação entre a GSK-3B e o TB obteve-se por estudos sobre os fármacos utilizados para seu tratamento ou estudos que utilizaram modelos animais (Roh et al., 2003; Roh et al., 2005, Jope et al., 2006). Embora a GSK-3B tenha sido estudada no cérebro *post-mortem* de pacientes com TB (Lesort et al., 1999; Beasley et al., 2002), até o momento, apenas quatro trabalhos investigaram a expressão, a fosforilação ou a atividade desta enzima utilizando derivados sanguíneos de pacientes com transtornos de humor (Li et al., 2007; Li et al., 2010; Pandey et al., 2010; Polter et al., 2010). Os resultados ainda são controversos e nenhum dos estudos avaliou a fosforilação ou inferiu a atividade da GSK-3B em plaquetas de pacientes com TB. Além disso, nenhum desses estudos investigou a GSK-3B em indivíduos idosos com TB. Li e colaboradores (Li et al., 2007) observaram que os níveis da forma fosforilada da GSK-3B (fosfo-GSK-3B) eram maiores em células mononucleares de indivíduos com TB em tratamento (com lítio ou outros estabilizadores), quando comparados com

controles saudáveis. Eles avaliaram ainda o efeito do tratamento *in vitro* com lítio, em tais células, e encontraram resultante aumento na fosforilação da GSK-3B. Outro estudo do mesmo grupo demonstrou que o nível de fosforilação da GSK-3 estava diminuído em células mononucleares de indivíduos em episódio maníaco ou hipomaníaco do TB tipo I e II, não medicados, comparados com controles saudáveis, porém sem observar alterações significantes na expressão total da GSK-3 (Polter et al., 2010). Ainda em outro estudo, também com células mononucleares, Li e colaboradores (Li et al., 2010) observaram que a expressão proteica da GSK-3 se encontrava elevada, com tendência para menor fosforilação, sugerindo atividade de GSK-3 maior em pacientes com TB em mania, comparado com controles saudáveis. Avaliaram também a resposta *in vivo* da GSK-3B durante tratamento de oito semanas, quando observaram aumento na fosforilação da GSK-3, sem alterações na expressão total da GSK-3. Pandey e colaboradores (Pandey et al., 2010) observaram que a expressão proteica de GSK-3B em plaquetas de pacientes com TB, sem tratamento, estava reduzida em relação aos controles, e que, após oito semanas de tratamento com estabilizadores de humor, a expressão da enzima em plaquetas aumentou para níveis próximos aos do grupo controle. Além do presente trabalho, nosso grupo de pesquisa conduz outras investigações acerca da atividade da GSK-3B de pacientes idosos com transtornos do humor. Diniz e colaboradores (Diniz et al., 2011) determinaram a atividade de GSK-3B em plaquetas de pacientes idosos com depressão maior, sem tratamento, e em idosos saudáveis. Observaram que os pacientes com depressão tinham maior atividade de GSK-3B (inferida por uma fração diminuída da fosfo-GSK-3B, na ausência de diferenças significantes do total da GSK-3B (GSK-3B total), quando comparadas aos controles) e que a atividade correlacionava-se com a gravidade dos sintomas depressivos e cognitivos. Em outro trabalho recém publicado, Joaquim et al. (2012) observaram que o tratamento desses indivíduos com sertralina aumenta a fosfo-GSK-3B nesses pacientes, após 12 meses. Um

trabalho, em andamento, avalia resposta da GSK-3B ao tratamento com lítio para depressão em pacientes jovens com transtorno bipolar.

2. OBJETIVOS

Os objetivos primários deste estudo são: (1) comparar a expressão da enzima GSK-3B (total e fosforilada) em plaquetas de pacientes idosos com TB, com idosos saudáveis; (2) estimar indiretamente a atividade enzimática em plaquetas de sujeitos nestes dois grupos, por meio do cálculo da razão entre a expressão da forma inativa (fosfo-GSK-3B) e da GSK-3B total.

Os objetivos secundários deste estudo são: (1) investigar diferenças na atividade inferida da GSK-3B, em pacientes com TB de acordo com as seguintes características clínicas: idade; idade de início do transtorno; tempo de doença; magnitude dos sintomas afetivos; grau de comprometimento cognitivo; presença de demência; subtipo do transtorno; estado afetivo atual; história prévia de internações; polaridade do primeiro episódio; medicações psiquiátricas em uso.

3. HIPÓTESES

A hipótese primária do presente trabalho é que a atividade da GSK-3B encontra-se diminuída nos pacientes com TB cronicamente medicados com estabilizadores do humor.

Como hipótese secundária é que a alteração da atividade enzimática inferida correlaciona-se com variáveis clínicas dos pacientes com transtorno bipolar e com parâmetros inerentes ao tratamento (tipo de estabilizador de humor utilizado).

4. MÉTODOS

4.1 Desenho

Estudo clínico, caso-controle, transversal.

4.2 Contexto

O estudo conduziu-se em ambiente ambulatorial no Instituto de Psiquiatria do Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo. A coleta de sangue e as análises laboratoriais realizaram-se no Laboratório de Neurociências – LIM27, do mesmo instituto.

4.3 Amostra

Todos os pacientes e controles foram recrutados, de maneira voluntária, entre os idosos em acompanhamento, no Ambulatório de Psiquiatria Geriátrica do Laboratório de Neurociências – LIM 27, no Instituto de Psiquiatria do Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os idosos do grupo controle foram recrutados a partir de coorte de idosos em seguimento regular neste ambulatório, como parte de um estudo longitudinal sobre envelhecimento e memória (Diniz et al 2008). Todos os pacientes e controles incluídos no estudo assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo A) e passaram por todas as avaliações clínicas e laboratoriais propostas para o presente trabalho.

4.4 Critérios de inclusão

4.4.1 Pacientes com Transtorno Afetivo Bipolar

Estipularam-se critérios de inclusão:

- Idade acima de 60 anos;
- Diagnóstico de TB, de acordo com os critérios do DSM-IV.

4.4.2 Idosos saudáveis (grupo controle):

Estipularam-se critérios de inclusão:

- Idade acima de 60 anos;
- Sem história atual ou pregressa de transtorno depressivo recorrente ou outros transtornos psiquiátricos maiores;
- Não estar em uso atual de medicações antidepressivas ou estabilizadores de humor.
- Ausência de quadro demencial.

4.5 Critérios de exclusão

Excluíram-se sujeitos que apresentavam:

- deficiências sensoriais e intelectuais que os impediam de desempenhar adequadamente os testes necessários para avaliação das funções cognitivas;
- doenças clínicas com impacto sobre a capacidade cognitiva;

- Instabilidade clínica ou saúde frágil, no momento da avaliação inicial;
- outros transtornos psiquiátricos maiores, tais como esquizofrenia;
- história ou evidências de alcoolismo ou abuso de substâncias depressoras do sistema nervoso central;
- uso atual de medicamentos com propriedades anticolinérgicas em doses altas;
- uso de medicações clínicas que pudessem alterar as análises da GSK-3B (ex., insulina).
- recusa em assinar o termo de consentimento livre e esclarecido.

4.6 Avaliação do estado mental

O diagnóstico de TB realizou-se através da versão brasileira da Entrevista Clínica Estruturada para o Diagnóstico de Transtornos do Eixo I do DSM IV (SCID – I/P) (First et al., 2002; Pang et al., 2005). Empregaram-se a Escala de Depressão de Hamilton – 21 itens (HAM – D) (Hamilton, 1960) e a Escala de Avaliação de Mania de Young (YMRS) (Young et al., 1978; Vilela et al., 2005) para avaliação da gravidade do episódio atual.

4.6.1 Classificação do transtorno bipolar

Classificaram-se os pacientes de acordo com a gravidade dos sintomas atuais e idade de início do transtorno bipolar.

4.6.1.1 Classificação do episódio atual

Os pacientes foram classificados de acordo com a gravidade dos sintomas depressivos ou maníacos atuais em:

- Episódio depressivo leve a moderado: Escores na HAM-D 21 entre 7 e 21 pontos;
- Episódio depressivo atual grave: Escore na HAM-D 21 maior ou igual a 22 pontos;
- Eutimia: HAM-D e YMRS menores que 7 pontos;
- Hipomania: YMRS entre 7 e 14 pontos;
- Episódio de mania: acima de 14 pontos;
- Episódio misto: 7 ou mais pontos em ambas as escalas, desde que presentes os sintomas-chave para o diagnóstico de episódio depressivo e episódio maníaco ou hipomaníaco, ao mesmo tempo.

4.6.1.2 Classificação de acordo com a idade de início do transtorno

Classificaram-se os pacientes de acordo com a idade de surgimento do 1º episódio depressivo ou maníaco ao longo da vida em (Yassa et al., 1988):

- TB de início não tardio: 1º episódio depressivo ocorreu antes dos 50 anos de idade.
- TB de início tardio: 1º episódio depressivo ocorreu após os 50 anos de idade;

4.7 Avaliação cognitiva e funcional

A avaliação cognitiva inicial realizou-se através da entrevista semi-estruturada CAMDEX (*Cambridge Examination for Mental Disorders of the Elderly*) (Roth et al., 1986), em sua versão traduzida e adaptada para a Língua Portuguesa (Bottino et al., 1999) que produz as escalas de avaliação CAMCOG (Cambridge Cognitive Test), Mini-exame do Estado Mental (MEEM, Folstein et al., 1975), Teste Mental Abreviado (AMT, Abreviated Mental Test) (Hodkinson, 1972) e do Teste do Desenho do Relógio (TDR, Sunderland et al., 1989). Posteriormente, os sujeitos submeteram-se a uma avaliação clínica, e ao exame neuropsicológico e funcional. O diagnóstico cognitivo foi formulado em reuniões de consenso multidisciplinar, por uma equipe que incluiu médicos (psiquiatras, neurologista e geriatra), neuropsicólogas, fonoaudióloga, fisioterapeuta e terapeuta ocupacional. Nesses encontros, discutiram-se os dados clínicos, psicométricos, laboratoriais e de neuroimagem disponíveis.

4.8 Procedimentos laboratoriais

As análises laboratoriais deste projeto de pesquisa realizaram-se no Laboratório de Neurociências (LIM-27) do Departamento e Instituto de Psiquiatria da Faculdade de Medicina da USP.

4.8.1 Coleta de sangue e preparo de plaquetas

Após a avaliação do estado mental, os pacientes realizaram coleta de amostra de sangue através de punção venosa, em veia antecubital, no

período matutino (entre 8h e 10h). Todos os sujeitos estavam em jejum de 8 a 10 horas.

Após a coleta (em intervalo máximo de 30 minutos), as amostras de sangue foram centrifugadas a 515xG por 15 minutos a 20°C, em uma solução de dextrose e citrato ácido. Alíquotas de plasma rico em plaquetas (PRP) foram ressuspensas em solução de lavagem (citrato de sódio 30nM pH 6.5, cloreto de potássio 5nM, cloreto de cálcio 2nM, cloreto de magnésio 1nM, glicose 5nM, albumina 500 µg/ml e apirase 50µg/ml), centrifugadas a 1159xG por 8 minutos a 20°C. O sobrenadante foi ressuspensado em solução de tris-sucrose e as alíquotas de plaquetas foram armazenadas imediatamente em freezer a -70°C até a análise.

4.8.2 Expressão de GSK-3B em plaquetas

Antes das análises bioquímicas, determinou-se a concentração proteica de cada amostra de plaqueta através do método de Lowry (Lowry et al., 1951) modificado (Bio-Rad DC Protein Assay) e a concentração de proteínas para cada amostra foi normalizada para 0,1 mg com o tampão apropriado e o coquetel de inibidor de protease fornecido pelo fabricante do kit de análise bioquímica (*vide abaixo*).

Os níveis da proteína GSK-3B (GSK-3B total e da fosfo-GSK-3B) foram determinados nas amostras de plaquetas através de um Ensaio Imunométrico Enzimático (*EIA - Enzyme Immunometric Assay*) (TiterZyme EIA - Assay Designs, Inc). Trata-se de um ensaio que utiliza anticorpos monoclonais imobilizados na parede da placa de ensaio e que se liga a GSK-3B humana presente nas soluções padrões e nas amostras. Os pontos da curva de padronização do ensaio geraram-se a partir de diluições seriadas das amostras (fosfo-GSK-3B: 2000; 1000; 500; 250; 125; 62.5; e 0 pg/ml; GSK-3B total: 5000; 2500; 1250; 625; 312.5; 156.3; 78.1; e 0 pg/ml).

Cem microlitros de solução padrão ou amostra de plaquetas foram pipetados em cada poço da placa de ensaio. Esta foi vedada e incubada em temperatura ambiente, sob agitação, por 1 hora. Após a incubação, cada poço foi esvaziado e a placa de ensaio lavada com 400 µl de solução de lavagem. Este procedimento foi repetido por cinco vezes. Após a última lavagem, 100 µl de anticorpos policlonais anti-GSK-3B total e anti-fosfo-GSK-3B foram adicionado a cada poço da placa de ensaio, exceto nos poços vazios. A placa de ensaio foi vedada e incubada em temperatura ambiente, sob agitação, por mais 1 hora. Novamente, esvaziaram-se e lavaram-se as placas de ensaio por cinco vezes. Cem microlitros de anticorpos monoclonais anti-GSK-3B total e anti-fosfo-GSK-3B conjugados com *horseradish peroxidase*, que se ligam aos anticorpos policlonais anti-GSK-3B total e anti-fosfo-GSK-3B, foram adicionados a cada poço da placa de ensaio. Esta foi vedada e incubada em temperatura ambiente, sob agitação, por 30 minutos. A placa de ensaio foi esvaziada e lavada por 5 vezes. Cem microlitros de solução substrato foram adicionados a cada poço da placa de ensaio e a reação enzimática foi interrompida após incubação por 30 minutos em temperatura ambiente. A cor gerada pela reação enzimática foi lida na frequência de 450 nm.

4.8.3 Determinação indireta da atividade enzimática

A atividade da GSK-3B para cada amostra foi inferida indiretamente pela razão da GSK-3B, como descrito anteriormente pelo nosso grupo (Forlenza et al., 2010). Obtém-se a razão da GSK-3B dividindo-se a porção fosforilada (inativa) da GSK-3B pelo total da enzima (fosfo-GSK-3B / GSK-3B total). A razão da GSK-3B nos informa sobre a proporção entre a concentração da forma inativa da proteína (fosfo-GSK-3B) e sua concentração total em uma amostra e, desta forma, fornece uma estimativa

inversa da atividade da GSK-3B. Portanto, quanto maior a razão da GSK-3B (medida por esta fórmula), menor a atividade da GSK-3B e vice-versa.

4.9 Análise dos dados

Dados descritivos foram gerados.

Para análise da distribuição de variáveis categoriais, utilizou-se o teste do Qui-quadrado de Pearson. O teste Kolmogorov-Smirnov e a inspeção do gráfico Q-Q foram realizados para avaliar se as variáveis contínuas seguiam distribuição normal. Para comparação entre dois grupos, as variáveis contínuas com distribuição normal foram analisadas por meio do teste t de Student ou, alternativamente, pelo teste de Mann-Whitney. Para a comparação de variáveis contínuas havendo mais de dois grupos, utilizou-se o teste de ANOVA. Quando encontradas diferenças estatisticamente significantes nas ANOVAs, realizaram-se os testes de Dunnett (heterogeneidade) ou de Tukey (homogeneidade) para comparações 2 X 2.

A correlação entre duas variáveis foi avaliada por meio do teste de correlações de Spearman, dada a ausência de distribuição normal entre os parâmetros de interesse.

Os cálculos de poder amostral realizaram-se com a ajuda do programa G*Power v. 3.1.2 (Faul et al., 2009).

Procedeu-se a uma análise de regressão, para testar a influência da variável “diagnóstico” na fosforilação da GSK-3B quando controlada pelas possíveis variáveis de confusão, utilizando o método de seleção de variáveis “*Backwards*”.

Todas as análises estatísticas realizaram-se com o programa estatístico SPSS v.14 (Statistical Package for Social Science, Chicago, IL). O erro tipo I para os testes foi considerado como $\alpha=5\%$.

4.10 Aspectos éticos

Este estudo foi aprovado pela CAPPesq: Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo - Protocolo de Pesquisa nº 0500/09 (Anexo B).

5. RESULTADOS

5.1 Descrição da amostra

Fizeram parte desta amostra 63 sujeitos (31 pacientes com TB e 32 controles). As características demográficas e o desempenho cognitivo dos pacientes com TB e dos controles estão sumarizados na Tabela 1. A amostra de bipolares incluídos no estudo tinha idade média de 70,1 ($\pm 6,1$) anos, enquanto a do grupo do grupo controle, foi 73,1 ($\pm 6,2$) anos ($p=0,052$). A média de escolaridade foi maior no grupo controle ($10,8 \pm 4,6$), comparada à amostra dos pacientes com transtorno bipolar ($7,4 \pm 4,7$; $p=0,006$). Os grupos possuíam distribuição semelhante de gênero, com predomínio significativo do sexo feminino (71% da amostra total). Os bipolares apresentaram, no CAMCOG, desempenho cognitivo inferior aos obtidos pelo grupo controle ($76,8 \pm 17,1$ e $93,3 \pm 6,9$, respectivamente; $p < 0,001$).

Tabela 1 – Características demográficas e desempenho cognitivo

Característica	Bipolares (n = 31)	Controles (n = 32)	Valor de p
Idade (anos) **	70,1 \pm 6,1	73,1 \pm 6,2	0,052
Gênero, No. (%)*			0,633
Masculino	8 (26)	10 (31)	
Feminino	23 (74)	22 (69)	
Escolaridade (anos) **	7,4 \pm 4,7	10,8 \pm 4,6	0,006***
CAMCOG**	76,8 \pm 17,1	93,3 \pm 6,9	<0,001***

* Teste do Qui-quadrado; ** Teste t de Student; *** $p < 0,05$

Na tabela 2, estão presentes as variáveis relacionadas ao tratamento e curso do quadro clínico dos pacientes com TB. Quanto ao diagnóstico cognitivo dos pacientes com transtorno bipolar, oito pacientes tinham diagnóstico de demência (25,8%) e, 23, não tinham esse diagnóstico (74,2%). Quanto ao subtipo do transtorno bipolar, 24 tinham diagnóstico de

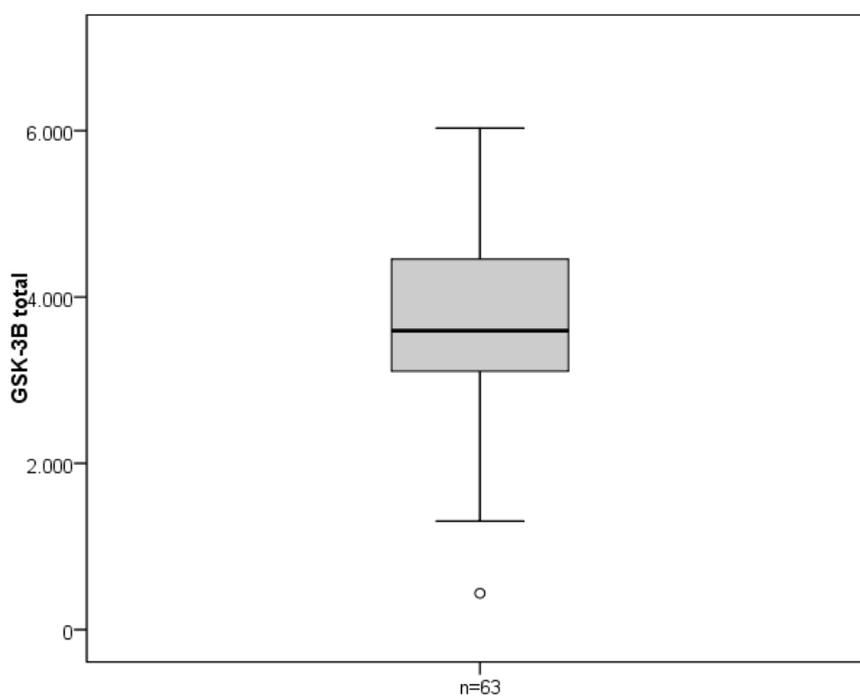
TB tipo I (77,4%) e sete tinham diagnóstico de TB tipo II (22,6%). Quanto à idade de início do transtorno, 27 tiveram o início antes dos 50 anos (87,1%) e 4, após os 50 anos (12,9%). Quanto ao estado afetivo dos pacientes com TB avaliados neste corte transversal, 13 encontravam-se deprimidos (41,9%), 14 estavam eutímicos (45,2%), dois estavam em mania (6,5%), um em hipomania (3,2%) e um, em estado misto (3,2%). Todos os indivíduos com TB estavam em uso de um ou mais psicofármacos. Dos 31 pacientes com TB, 19 estavam em uso de lítio, 21 em uso de anticonvulsivantes, 17 em uso de antipsicóticos, 11 em uso de antidepressivos e 11 em uso de benzodiazepínicos.

Tabela 2 - Variáveis relacionadas ao tratamento e curso do quadro clínico dos pacientes com TB

Característica	TB n = 31
Diagnóstico cognitivo, No. (%)	
Demência	8 (25,8)
Não demência	23 (74,2)
Medicamento, No. (%)	
Lítio	19 (61,3)
Anticonvulsivantes	21 (67,7)
<i>Ácido valpróico</i>	10 (32,3)
<i>Lamotrigina</i>	5 (12,9)
<i>Oxcarbazepina</i>	5 (12,9)
<i>Outros anticonvulsivantes</i>	2 (3,2)
Antipsicóticos	17 (54,8)
Antidepressivos	11 (35,5)
Fase, No. (%)	
Depressão	13 (41,9)
Eutimia	14 (45,2)
Mania	2 (6,5)
Hipomania	1 (3,2)
Episódio misto	1 (3,2)
Início do transtorno, No. (%)	
Início não tardio (<50 anos)	27 (87,1)
Início tardio (>50 anos)	4 (12,9)
Subtipo do transtorno, No. (%)	
TB tipo I	24 (77,4)
TB tipo II	7 (22,6)

5.2 Expressão total da GSK-3B, sua fração fosforilada no resíduo de serina-9 e razão da GSK-3B em plaquetas de pacientes com TB e em controles.

As distribuições dos níveis de GSK-3B total, fosfo-GSK-3B e razão da GSK-3B na amostra total estão apresentadas graficamente nas Figuras 1A, 1B e 1C, respectivamente.



A.

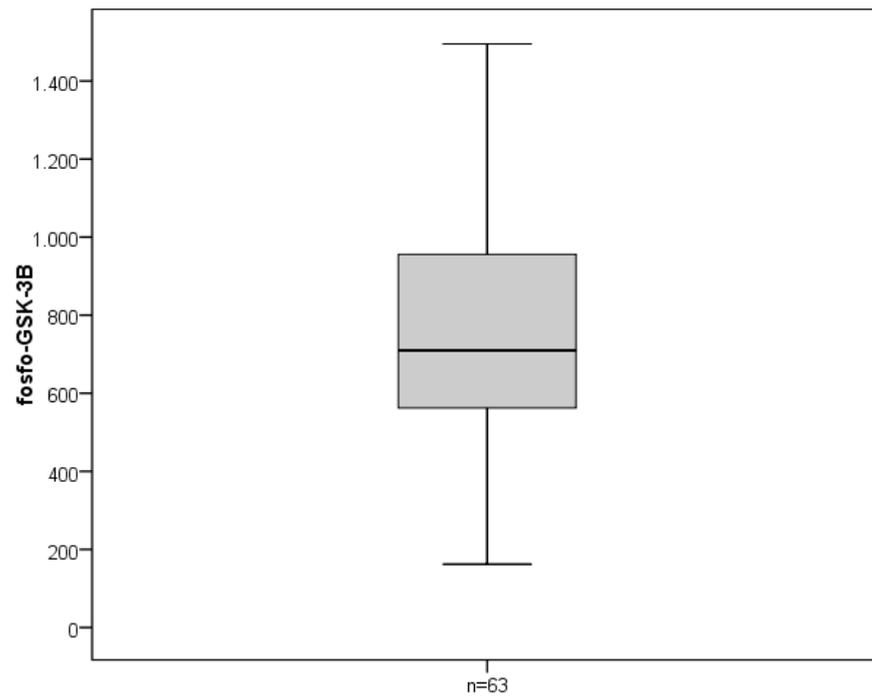
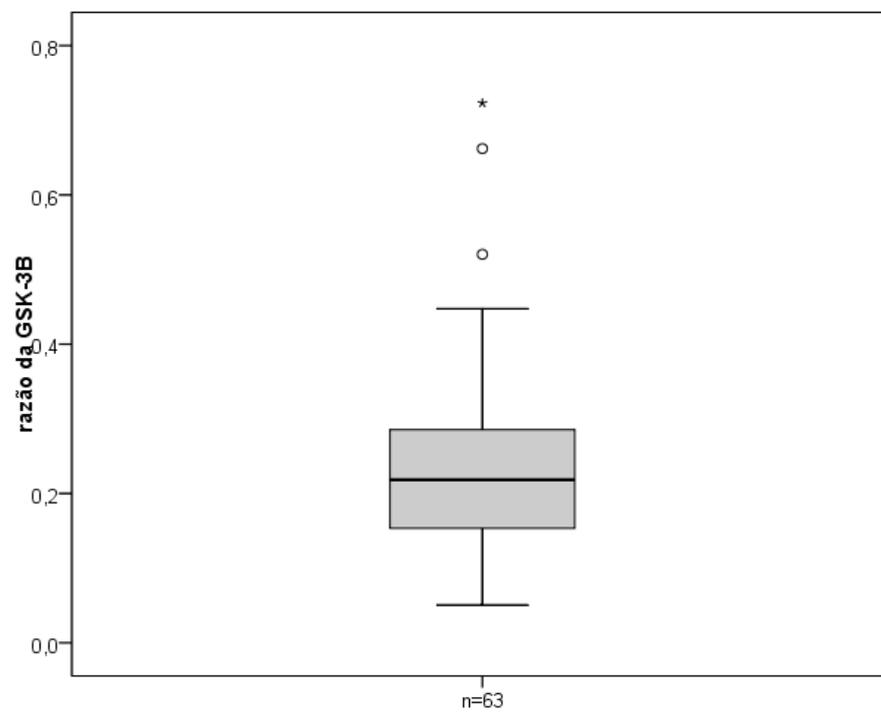
**B.****C.**

Figura 1. Os diagramas de caixa e bigodes (Box plot) representam a distribuição das concentrações (em pg/ml) de GSK-3B total (A) e fosfo-GSK-3B (B) em picogramas por mililitro, e razão da GSK-3B (C), em plaquetas da amostra total de 31 pacientes com transtorno bipolar (TB) e 32 controles saudáveis. As caixas indicam os quartis superiores e inferiores. A linha dentro de cada caixa representa a respectiva mediana. Os bigodes se estendem até os percentis 2,5 e 97,5. Os *outliers* são identificados por ^o e *, e foram excluídos das respectivas análises estatísticas. Aplicou-se o teste de Kolmogorov Smirnov para as variáveis representadas no diagrama, bem como inspeção visual dos gráficos Q-Q, e todas elas apresentaram distribuição normal. O teste t-Student foi, então, utilizado para as avaliações estatísticas.

Na tabela 3, pode-se ver que não se encontraram diferenças estatisticamente significantes nas concentrações médias da proteína GSK-3B das plaquetas dos bipolares ($3689,2 \pm 895,6$ pg/ml), comparadas às dos sujeitos do grupo controle ($3680,5 \pm 976,7$ pg/ml; $p=0,971$). Já a concentração da forma fosforilada (fosfo-GSK-3B) foi significativamente maior nos bipolares ($874,6 \pm 308,4$ pg/ml) do que nos controles ($698,0 \pm 267,7$), $t(61)=-2,43$; $p=0,018$; $d=0,71$. Também observou-se diferença na razão da GSK-3B entre os dois grupos ($0,238 \pm 0,079$ e $0,191 \pm 0,069$ para bipolares e controles, respectivamente), $t(58)=-2,47$; $p=0,016$; $d=0,64$.

Tabela 3 - Concentrações médias da GSK-3B total e fosfo-GSK-3B (em pg/ml) e razão da GSK-3B nos pacientes com TB e controles

	Bipolares (n=31)	Controles (n=32)	Valor de p
GSK-3B total	$3689,2 \pm 895,6$	$3680,5 \pm 976,7$	$p=0,971$
fosfo-GSK-3B	$874,6 \pm 308,4$	$698,0 \pm 267,7$	$p=0,018^*$
razão da GSK-3B	$0,238 \pm 0,079$	$0,191 \pm 0,069$	$p=0,016^*$

*Teste t de Student, $p < 0,05$

Análises de regressão linear (método *backward*) foram realizadas para identificar os preditores para fosforilação e razão da GSK-3B.

Selecionaram-se três variáveis independentes, a saber: diagnóstico (bipolar ou grupo controle), escolaridade (anos) e desempenho cognitivo (escore total obtido no CAMCOG). As variáveis dependentes foram a fosfo-GSK-3B e a razão da GSK-3B. Este processo inicia-se pela checagem da significância dos coeficientes da regressão e pela eliminação, em cada passo, da variável independente que apresentar menor valor. Os modelos preditivos finais foram compostos pelas variáveis com nível de significância $p < 0,1$. Encontrou-se que o diagnóstico era o preditor que influenciava a fosfo-GSK-3B (Beta=164,5 e $p=0,031$; tabela 4) e a razão da GSK-3B (Beta=0,046 e $p=0,024$; tabela 5).

Tabela 4 – Associação entre diagnóstico, idade e CAMCOG e a variável dependente fosfo-GSK-3B pela regressão linear, utilizando-se o método “Backward”

Passo	Variável independente	Coefficiente Beta	Desvio Padrão	Significância
1	(Constante)	557,2	283,8	0,054
	Diagnóstico	165,3	89,4	0,070
	Escolaridade	-12,5	9,5	0,192
	CAMCOG	3,0	3,4	0,383
2	(Constante)	789,7	103,0	<0,001
	Diagnóstico	132,0	80,9	0,108
	Escolaridade	-8,5	8,3	0,309
3	(Constante)	698,0	51,3	<0,001
	Diagnóstico	164,5	74,4	0,031

Tabela 5 – Associação entre diagnóstico, idade e CAMCOG e a variável dependente razão da GSK-3B pela regressão linear, utilizando-se o método “*Backward*”

Passo	Variável independente	Coefficiente Beta	Desvio Padrão	Significância
1	(Constante)	0,233	0,074	0,003
	Diagnóstico	0,036	0,024	0,132
	Escolaridade	-0,001	0,003	0,621
	CAMCOG	0,000	0,001	0,726
2	(Constante)	0,209	0,027	<0,001
	Diagnóstico	0,040	0,021	0,068
	Escolaridade	-0,002	0,002	0,446
3	(Constante)	0,191	0,014	<0,001
	Diagnóstico	0,046	0,020	0,024

5.3 Análise exploratória da influência de variáveis clínicas.

Os níveis de GSK-3B total, fosfo-GSK-3B e razão da GSK-3B em plaquetas de pacientes com TB com demência foram comparados com os de pacientes sem demência e com controles (Tabela 6). Não se encontraram diferenças estatisticamente significantes entre os três grupos.

Tabela 6 – Concentrações médias da GSK-3B total e fosfo-GSK-3B (em pg/ml) e razão da GSK-3B em plaquetas de pacientes com TB, segundo o diagnóstico cognitivo (com demência ou sem demência) e em controles

	Controles (n=32)	TB sem demência (n=8)	TB com demência (n=23)	Valor-p (ANOVA)
GSK-3B total	3680,5±976,7	3736,8 ± 943,7	3552,3 ± 780,7	0,892
fosfo-GSK-3B	698,0± 267,7	889,4 ± 335,7	832,0 ± 225,3	0,056
razão da GSK-3B	0,191 ±0,069	0,234± 0,072	0,248 ± 0,101	0,052

Os níveis de GSK-3B total, fosfo-GSK-3B e razão da GSK-3B em plaquetas de pacientes com TB tipo I foram comparados com os de pacientes TB tipo II e com controles (Tabela 7). Encontraram-se diferenças estatisticamente significantes entre os grupos, quanto à fosfo-GSK-3B ($p=0,006$, $\eta^2=0,187$) e à razão da GSK-3B ($p=0,010$, $\eta^2=0,136$). Análises *pos-hoc* mostraram que os pacientes com TB tipo I tinham maior concentração da fosfo-GSK-3B (Dunnett, $p=0,002$) e maior razão da GSK-3B (Tukey, $p=0,007$) que o grupo controle.

Tabela 7 – Concentrações médias da GSK-3B total e fosfo-GSK-3B (em pg/ml) e razão da GSK-3B em plaquetas de pacientes com TB, de acordo com o subtipo clínico (tipo I ou tipo II) e em controles

	Controles (n=32)	TB tipo I (n=24)	TB tipo II (n=7)	Valor-p (ANOVA)
GSK-3B total	3680,5 ± 976,7	3802,7 ± 782,1	3300,2 ± 1198,9	0,253
fosfo-GSK-3B	698,0 ± 267,7**	930,9 ± 302,8**	681,4 ± 260,7	0,006*
razão da GSK-3B	0,191 ± 0,069***	0,250 ± 0,079***	0,191 ± 0,066	0,010*

* $p < 0,05$; ** Teste *post hoc* Dunnet indicou diferença entre os grupos marcados, $p = 0,002$;
*** Teste *post hoc* Tukey indicou diferença entre os grupos marcados, $p = 0,007$.

Os níveis de GSK-3B total, fosfo-GSK-3B e razão da GSK-3B em plaquetas de pacientes com TB em fase (hipomania, mania, depressão ou episódio misto) foram comparados com os de pacientes TB em eutimia e com controles (Tabela 8). Encontraram-se diferenças estatisticamente significantes entre os grupos, quanto à fosfo-GSK-3B ($p = 0,003$, $\eta^2 = 0,164$) e à razão da GSK-3B ($p = 0,07$, $\eta^2 = 0,146$). Análises *pos-hoc* mostraram que os pacientes com TB em fase tinham maior concentração da fosfo-GSK-3B (Tukey, $p = 0,002$) e maior razão da GSK-3B (Tukey, $p = 0,005$) que o grupo controle.

Tabela 8 – Concentrações médias da GSK-3B total e fosfo-GSK-3B (em pg/ml) e razão da GSK-3B em plaquetas de pacientes com TB, de acordo com o estado afetivo atual (fase ou eutimia) e em controles

	Controles (n=32)	TB em Fase (n=17)	TB em eutimia (n=14)	Valor-p (ANOVA)
GSK-3B total	3680,5 ± 976,7	3754,7 ± 828,9	3609,8 ± 996,4	0,593
fosfo-GSK-3B	698,0 ± 267,7**	943,8 ± 331,1**	790,5 ± 265,9	0,003*
razão da GSK-3B	0,191 ± 0,069***	0,251 ± 0,061***	0,221 ± 0,097	0,07*

* $p < 0,05$; ** Teste *post hoc* Tukey indicou diferença entre os grupos marcados, $p = 0,002$;
*** Teste *post hoc* Tukey indicou diferença entre os grupos marcados, $p = 0,005$.

Os níveis de GSK-3B total, fosfo-GSK-3B e razão da GSK-3B em plaquetas de pacientes com TB, segundo o estado afetivo atual (episódio depressivo ou eutímia) e com controles (Tabela 9). Encontraram-se diferenças estatisticamente significantes entre os grupos, quanto à fosfo-GSK-3B ($p=0,026$, $\eta^2=0,114$) e à razão da GSK-3B ($p=0,023$, $\eta^2=0,124$). Análises *pos-hoc* mostraram que os pacientes com TB em episódio polo depressivo tinham maior concentração da fosfo-GSK-3B (Tukey, $p=0,025$) e maior razão da GSK-3B (Tukey, $p=0,017$) que o grupo controle.

Tabela 9 – Concentrações médias da GSK-3B total e fosfo-GSK-3B (em pg/ml) e razão da GSK-3B em plaquetas de pacientes com TB, de acordo com o estado afetivo atual (episódio depressivo ou eutímia) e em controles

	Controles (n=32)	TB episódio depressivo (n=13)	TB eutímia (n=14)	Valor-p (ANOVA)
GSK-3B total	3680,5±976,7	3690,6± 869,1	3609,8 ± 996,4	0,842
fosfo-GSK-3B	698,0±267,7**	892,9± 340,6**	790,5 ± 265,9	0,026*
Razão da GSK-3B	0,191±0,069***	0,243±0,068***	0,221±0,097	0,023*

* $p<0,05$; ** Teste *post hoc* Tukey indicou diferença entre os grupos marcados, $p=0,025$;

*** Teste *post hoc* Tukey indicou diferença entre os grupos marcados, $p=0,017$.

Os níveis de GSK-3B total, fosfo-GSK-3B e razão da GSK-3B em plaquetas de pacientes com TB com história prévia de internação psiquiátrica foram comparados com os de pacientes com TB história prévia de internação psiquiátrica e com controles (Tabela 10). Encontraram-se diferenças estatisticamente significantes entre os grupos, quanto à fosfo-GSK-3B ($p=0,019$, $\eta^2=0,136$) e à razão da GSK-3B ($p=0,031$, $\eta^2=0,107$). Análises *pos-hoc* mostraram que os pacientes com TB com história prévia de internação psiquiátrica tinham maior concentração da fosfo-GSK-3B

(Dunnett, $p=0,007$) e maior razão da GSK-3B (Tukey, $p=0,039$) que o grupo controle.

Tabela 10 – Concentrações médias da GSK-3B total e fosfo-GSK-3B (em pg/ml) e razão da GSK-3B em plaquetas de pacientes com TB, de acordo com o histórico de internação psiquiátrica e em controles

	Controles (n=32)	TB com HP de internação (n=17)	TB sem HP de internação (n=12)	Valor-p (ANOVA)
GSK-3B total	3680,5±976,7	3716,4± 791,3	3484,9±1010,9	0,246
Fosfo-GSK-3B	698,0±267,7**	867,6±271,1**	841,7± 346,5	0,019*
razão da GSK-3B	0,191±0,069***	0,241±0,083***	0,233±0,080	0,031*

HP, História prévia; * $p<0,05$; ** Teste *post hoc* Dunnett indicou diferença entre os grupos marcados, $p=0,007$; *** Teste *post hoc* Tukey indicou diferença entre os grupos marcados, $p=0,039$.

Os níveis de GSK-3B total, fosfo-GSK-3B e razão da GSK-3B em plaquetas de pacientes com TB, segundo a polaridade do primeiro episódio afetivo (mania ou depressão) e com controles (Tabela 11). Encontraram-se diferenças estatisticamente significantes entre os grupos, quanto à fosfo-GSK-3B ($p=0,026$, $\eta^2=0,128$) e à razão da GSK-3B ($p=0,016$, $\eta^2=0,126$). Análises *pos-hoc* mostraram que os pacientes com TB com primeiro episódio em polo depressivo tinham maior concentração da fosfo-GSK-3B (Dunnett, $p=0,017$) e maior razão da GSK-3B (Tukey, $p=0,056$) que o grupo controle.

Tabela 11 – Concentrações médias da GSK-3B total e fosfo-GSK-3B (em pg/ml) e razão da GSK-3B em plaquetas de pacientes com TB, de acordo com a polaridade do primeiro episódio afetivo (mania ou depressão) e em controles

	Controles (n=32)	TB 1º episódio mania (n=6)	TB 1º episódio depressão (n=23)	Valor-p (ANOVA)
GSK-3B total	3680,5±976,7	3358,6± 660,4	3699,6± 946,2	0,375
Fosfo-GSK-3B	698,0±267,7**	917,5± 282,1	855,3± 324,7**	0,026*
Razão da GSK-3B	0,191±0,069***	0,284± 0,107	0,228±0,070***	0,016*

* $p < 0,05$; ** Teste *post hoc* Dunnett indicou diferença entre os grupos marcados, $p = 0,017$; *** Teste *post hoc* Tukey indicou diferença entre os grupos marcados, $p = 0,056$.

Os níveis de GSK-3B total, fosfo-GSK-3B e razão da GSK-3B em plaquetas de pacientes com TB, segundo o uso de lítio e com controles (Tabela 12). Encontraram-se diferenças estatisticamente significantes entre os grupos, quanto à fosfo-GSK-3B ($p = 0,008$, $\eta^2 = 0,137$) e à razão da GSK-3B ($p = 0,018$, $\eta^2 = 0,120$). Análises *pos-hoc* mostraram que os pacientes com TB em uso de lítio tinham maior concentração da fosfo-GSK-3B (Tukey, $p = 0,007$) e maior razão da GSK-3B (Tukey, $p = 0,014$) que o grupo controle.

Tabela 12 – Concentrações médias da GSK-3B total e fosfo-GSK-3B (em pg/ml) e razão da GSK-3B em plaquetas de pacientes com TB, de acordo com o uso de lítio e em controles

	Controles (n=32)	TB em uso de lítio (n=19)	TB não uso de lítio (n=12)	Valor-p (ANOVA)
GSK-3B total	3680,5±976,7	3688,1± 992,3	3691,01±759,1	0, 552
fosfo-GSK-3B	698,0±267,7**	911,69±303,6**	815,8 ± 320,2	0, 008 *
razão da GSK-3B	0,191±0,069***	0,246±0,068***	0,226 ± 0,095	0, 018 *

* $p < 0,05$; ** Teste *post hoc* Tukey indicou diferença entre os grupos marcados, $p = 0,007$; *** Teste *post hoc* Tukey indicou diferença entre os grupos marcados, $p = 0,014$.

Os níveis de GSK-3B total, fosfo-GSK-3B e razão da GSK-3B em plaquetas de pacientes com TB, segundo o uso de antidepressivos e com controles (Tabela 13). Encontraram-se diferenças estatisticamente significantes entre os grupos, quanto à fosfo-GSK-3B ($p=0,005$, $\eta^2=0,137$) e à razão da GSK-3B ($p=0,007$, $\eta^2=0,118$). Análises *pos-hoc* não indicaram diferenças estatisticamente significantes entre os pacientes que usavam antidepressivos e o grupo controle. Os testes revelaram diferença significativa entre os pacientes com TB que não usavam antidepressivo e o grupo controle, com maior concentração da fosfo-GSK-3B (Tukey, $p=0,065$) e maior razão da GSK-3B (Tukey, $p=0,006$) nos pacientes com TB que não usavam antidepressivo.

Tabela 13 – Concentrações médias da GSK-3B total e fosfo-GSK-3B (em pg/ml) e razão da GSK-3B em plaquetas de pacientes com TB, de acordo com o uso de antidepressivos e em controles

	Controles (n=32)	TB em uso de antidepressivos (n=11)	TB não uso de antidepressivos (n=20)	Valor-p (ANOVA)
GSK-3B total	3680,5±976,7	3676,9 ± 869,8	3696,0 ± 931,7	0,998
fosfo-GSK-3B	698,0±267,7**	719,9 ± 237,9	959,6 ± 314,6**	0,005 *
razão da GSK-3B	0,191±0,069***	0,202 ± 0,063	0,259 ± 0,081***	0,007 *

* $p<0,05$; ** Teste *post hoc* Tukey indicou diferença entre os grupos marcados, $p=0,065$;

*** Teste *post hoc* Tukey indicou diferença entre os grupos marcados, $p=0,006$.

Os níveis de GSK-3B total, fosfo-GSK-3B e razão da GSK-3B em plaquetas de pacientes com TB, segundo o uso de anticonvulsivantes e com controles (Tabela 14). Encontraram-se diferenças estatisticamente significantes entre os grupos, quanto à fosfo-GSK-3B ($p=0,009$, $\eta^2=0,191$) e à razão da GSK-3B ($p=0,008$, $\eta^2=0,141$). Análises *pos-hoc* não indicaram diferenças estatisticamente significantes entre os pacientes que usavam anticonvulsivantes e o grupo controle. Os testes revelaram diferença significativa entre os pacientes com TB que não usavam anticonvulsivantes e

o grupo controle, com maior concentração da fosfo-GSK-3B (Dunnett, $p=0,024$) e maior razão da GSK-3B (Tukey, $p=0,007$) nos pacientes com TB que não usavam anticonvulsivante.

Tabela 14 – Concentrações médias da GSK-3B total e fosfo-GSK-3B (em pg/ml) e razão da GSK-3B em plaquetas de pacientes com TB, de acordo com o uso de anticonvulsivantes e em controles

	Controles (n=32)	TB em uso de Anticonvulsivante (n=21)	TB não uso de anticonvulsivante (n=10)	Valor-p (ANOVA)
GSK-3B total	3680,5±976,7	3786,3 ± 776,0	3485,3 ± 1125,7	0,998
Fosfo-GSK-3B	698,0±267,7**	844,0 ± 318,8	938,78 ± 290,7**	0,005 *
Razão da GSK-3B	0,191±0,069***	0,225 ± 0,072	0,268 ± 0,090***	0,007 *

* $p<0,05$; ** Teste *post hoc* Dunnett indicou diferença entre os grupos marcados, $p=0,024$;
*** Teste *post hoc* Tukey indicou diferença entre os grupos marcados, $p=0,007$.

Os níveis de GSK-3B total, fosfo-GSK-3B e razão da GSK-3B em plaquetas de pacientes com TB, segundo o uso de antipsicóticos e com controles (Tabela 15). Encontraram-se diferenças estatisticamente significantes entre os grupos, quanto à fosfo-GSK-3B ($p=0,009$, $\eta^2=0,133$) e à razão da GSK-3B ($p=0,011$, $\eta^2=0,133$). Análises *pos-hoc* não indicaram diferenças estatisticamente significantes entre os pacientes que usavam antipsicóticos e o grupo controle. Os testes revelaram diferença significativa entre os pacientes com TB que não usavam antipsicóticos e o grupo controle, com maior concentração da fosfo-GSK-3B (Tukey, $p=0,013$) e maior razão da GSK-3B (Tukey, $p=0,008$) nos pacientes com TB que não usavam antipsicóticos.

Tabela 15 – Concentrações médias da GSK-3B total e fosfo-GSK-3B (em pg/ml) e razão da GSK-3B em plaquetas de pacientes com TB, de acordo com o uso de antipsicóticos e em controles

	Controles (n=32)	TB em uso de antipsicóticos (n=13)	TB não uso de antipsicóticos (n=14)	Valor-p (ANOVA)
GSK-3B total	3680,5±976,7	3844,2 ± 785,2	3501,0 ± 1011,2	0,330
fosfo-GSK-3B	698,0±267,7**	868,3 ± 308,4	882,3 ± 328,0**	0,009 *
razão da GSK-3B	0,191±0,069***	0,232 ± 0,085	0,246 ± 0,072***	0,011 *

* $p < 0,05$; ** Teste *post hoc* Tukey indicou diferença entre os grupos marcados, $p = 0,013$;

*** Teste *post hoc* Tukey indicou diferença entre os grupos marcados, $p = 0,008$.

Os níveis de GSK-3B total, fosfo-GSK-3B e razão da GSK-3B em plaquetas de pacientes com TB, segundo o uso de benzodiazepínicos e com controles (Tabela 16). Encontraram-se diferenças estatisticamente significantes entre os grupos, quanto à fosfo-GSK-3B ($p = 0,010$, $\eta^2 = 0,131$) e à razão da GSK-3B ($p = 0,028$, $\eta^2 = 0,107$). Análises *pos-hoc* não indicaram diferenças estatisticamente significantes entre os pacientes que usavam benzodiazepínicos e o grupo controle. Os testes revelaram diferença significativa entre os pacientes com TB que não usavam benzodiazepínicos e o grupo controle, com maior concentração da fosfo-GSK-3B (Tukey, $p = 0,010$) e maior razão da GSK-3B (Tukey, $p = 0,029$) nos pacientes com TB que não usavam benzodiazepínicos.

Tabela 16 – Concentrações médias da GSK-3B total e fosfo-GSK-3B (em pg/ml) e razão da GSK-3B em plaquetas de pacientes com TB, de acordo com o uso de benzodiazepínicos e em controles

	Controles (n=32)	TB em uso de benzodiazepínicos (n=11)	TB não uso de benzodiazepínicos (n=20)	Valor-p (ANOVA)
GSK-3B total	3680,5±976,7	3488,4± 1075,4	3799,7 ± 788,4	0,330
fosfo-GSK-3B	698,0±267,7**	750,7 ± 223,2	942,7 ± 332,0**	0,010 *
razão da GSK-3B	0,191±0,069***	0,211 ± 0,064	0,251 ± 0,083***	0,028 *

* $p < 0,05$; ** Teste *post hoc* Tukey indicou diferença entre os grupos marcados, $p = 0,010$;

*** Teste *post hoc* Tukey indicou diferença entre os grupos marcados, $p = 0,029$.

5.4 Análise exploratória de correlações com variáveis clínicas.

O teste de Spearman foi utilizado para avaliar possíveis correlações entre os níveis de GSK-3B total, fosforilada e razão da GSK-3B em plaquetas de pacientes com TB e as seguintes variáveis clínicas: dosagem sérica do lítio (litemia), idade de início dos sintomas (primeiro episódio), tempo de doença ou escores nas escalas HAM-D, YMRS e CAMCOG (Tabela 17). Não se observaram correlações significantes.

Tabela 17 – Correlações (ρ de Spearman) das concentrações plaquetárias de GSK-3B (total e fosforilada) e razão da GSK-3B com a litemia, idade de início dos sintomas do TB, tempo de doença ou escores na HAM-D, YMRS e CAMCOG de pacientes com TB

	GSK-3B total	Fosfo-GSK-3B	razão da GSK-3B
Litemia	0,180 ($p=0,342$)	0,299 ($p=0,109$)	0,298 ($p=0,116$)
Idade de início	-0,224 ($p=0,226$)	0,178 ($p=0,339$)	0,271 ($p=0,147$)
Tempo de doença	0,153 ($p=0,411$)	-0,166 ($p=0,371$)	-0,287 ($p=0,124$)
HAM-D 21	0,205 ($p=0,277$)	0,239 ($p=0,203$)	0,254 ($p=0,183$)
YMRS	0,213 ($p=0,258$)	0,298 ($p=0,110$)	0,185 ($p=0,337$)
CAMCOG	0,193 ($p=0,315$)	-0,119 ($p=0,540$)	0,033 ($p=0,867$)

6. DISCUSSÃO

Embora os níveis de GSK-3B tenham sido estudados previamente em cérebros *post-mortem*, ou em células periféricas de pacientes com TB (Beasley et al., 2001; Lesort et al., 1999; Li et al., 2007; Pandey et al., 2010; Polter et al., 2010; Li et al., 2010), os dados disponíveis na literatura são controversos e nenhum dos estudos avaliou atividade da GSK-3B (quer direta ou indiretamente) em plaquetas ou comparou a GSK-3B em indivíduos idosos com TB.

O objetivo principal deste estudo foi inferir a atividade da enzima GSK-3B em pacientes idosos com TB, em comparação com idosos saudáveis. Foram utilizadas plaquetas para medir a GSK-3B, uma vez que as plaquetas se mostraram um bom correlato periférico da GSK-3B cerebral. Além disso, a GSK-3B expressa-se em plaquetas em quantidades ainda maiores que em leucócitos (Forlenza et al., 2010).

A principal constatação deste estudo foi um aumento da razão da GSK-3B nos pacientes idosos com TB medicados, comparados a idosos saudáveis e, assim, uma menor atividade de GSK-3B inferida. Observou-se um aumento na proporção de formas inativas (fosfo-GSK-3B) da enzima em plaquetas de pacientes idosos com TB medicados, comparados a idosos saudáveis, sem que fosse encontrada diferença significativa na expressão da GSK-3B total. Desta forma, os resultados, em conjunto, confirmam a hipótese primária desse trabalho, de que a atividade da GSK-3B encontra-se diminuída neste grupo de pacientes idosos com TB medicados com estabilizadores de humor.

A GSK-3B é um importante componente da via Wnt (Dale, 1998; Gould et al., 2007), que está envolvida no desenvolvimento neuropsicomotor (Fradkin et al., 2005; Moon et al., 1997; Ciani e Salinas, 2005; Wodarz e Nusse, 1998). A GSK-3B está envolvida em vias apoptóticas (Bijur e Jope, 2001; Pap e Cooper, 1998) e no controle da expressão de fatores de crescimento de nervo, como o BDNF (Mai et al., 2002), mostrando-se envolvida não só na apoptose, mas também na manutenção da estabilidade estrutural do cérebro. A ideia de que GSK-3B pode desempenhar um papel

importante na fisiopatologia do TB está primariamente embasada na sugestão de que a GSK-3B é inibida direta e indiretamente pela ação do lítio e de outros estabilizadores do humor (Gould e Manji, 2002, Li & Jope, 2010; Pandey et al., 2010; Mendes et al., 2008). Além disso, diversas funções centrais relacionadas com essa enzima (regulação de cascatas de apoptose e do ciclo circadiano, por exemplo) também estão implicadas na fisiopatologia dos transtornos do humor, particularmente no TB (Machado-Vieira et al., 2009; Rowe et al., 2007).

Até onde sabemos, este é o primeiro trabalho a avaliar a fração fosforilada da enzima GSK-3B e a inferir a atividade dessa enzima em plaquetas de pacientes com TB. Pandey e colaboradores (2010) avaliaram apenas a expressão proteica total de GSK-3B em plaquetas de pacientes com TB. Eles observaram que a expressão proteica nos pacientes com TB, sem tratamento, estava reduzida em relação aos controles, e que, após oito semanas de tratamento com estabilizadores de humor, a expressão da enzima em plaquetas aumentou para níveis próximos aos do grupo controle. No presente estudo também observamos níveis da GSK-3B total de plaquetas de pacientes com TB cronicamente medicados e controles.

Quando os pacientes idosos com TB foram agrupados de acordo com diferentes características clínicas e medicações psiquiátricas em uso, observou-se que as seguintes características estavam associadas à maior fosfo-GSK-3B e razão da GSK-3B, em comparação a controles: subtipo I do TB, episódio atual não eutímico, história prévia de internação, episódio índice do tipo depressivo e o uso atual de lítio. Entretanto, não houve diferença significativa entre esses subgrupos de pacientes bipolares quando comparado aos demais pacientes bipolares que não tinham essas características. Esses achados são difíceis de serem interpretados, uma vez que, apesar das diferenças significantes encontradas entre alguns subgrupos de pacientes com TB e controles, a ausência de diferença significativa entre os subgrupos (pacientes com uma variável clínica vs. sem aquela variável clínica) não permite que se atribua a alteração da fosfo-GSK-

3B ou da razão da GSK-3B a alguma das variáveis consideradas nas análises por subgrupos.

A observação de que os pacientes idosos com TB tipo I e pacientes com TB em fase (depressão, mania, hipomania ou misto, considerados em conjunto) tinham maiores níveis da fosfo-GSK-3B e maior razão da GSK-3B que o grupo controle merece atenção, principalmente por que nestas análises, encontraram-se maiores efeitos (η^2) para diferença entre os grupos, quanto aos níveis de fosfo-GSK-3B (Subtipo TB vs. Controles) e quanto aos níveis da fosfo-GSK-3B (episódio atual vs. Controles), que nas análises dos pacientes com TB agrupados por outras variáveis clínicas, ou mesmo medicamentosas. Entretanto, interpretações acerca destes achados são difíceis de formularem-se, uma vez que a ausência de diferença significativa entre os subgrupos dos pacientes com TB (pacientes TB tipo I vs. TB tipo II; pacientes com TB em fase vs. pacientes com TB em eutimia) não permite que diferenças observadas nos níveis de fosfo-GSK-3B ou na razão da GSK-3B sejam atribuídas ao subtipo do transtorno ou ao episódio de alteração do humor.

A observação de que os pacientes com TB em uso de lítio tinham maiores níveis de fosfo-GSK-3B e maior razão da GSK-3B que o grupo controle, embora não esteja em nosso objetivo primário, merece importância, uma vez que são poucos os estudos que avaliaram a GSK-3B *in vivo*, em pacientes com TB que utilizavam lítio. Os resultados aqui apresentados estão de acordo com outros estudos que mostram aumento da fosforilação da GSK-3B em indivíduos adultos com TB em uso de lítio (Li et al., 2007; Li et al., 2010). Não foram observadas diferenças significantes entre a fosfo-GSK-3B e a razão da GSK-3B nos pacientes idosos com TB que usavam os demais psicofármacos avaliados (anticonvulsivantes, antipsicóticos, antidepressivos, benzodiazepínicos), quando comparados aos sujeitos idosos do grupo controle. Por outro lado, foram encontradas diferenças entre os pacientes com TB que não usavam essas medicações e os sujeitos do grupo controle. Todavia, as evidências da literatura acerca da

inibição da GSK-3B por outros fármacos são menos consistentes que as evidências da inibição dessa enzima pelo lítio (Machado-Vieira et al., 2010).

Também não observamos correlações entre os níveis de GSK-3B total, fosforilada e razão da GSK-3B em plaquetas de pacientes com TB e as seguintes variáveis clínicas contínuas, como a dosagem sérica do lítio (litemia), a idade de início dos sintomas (primeiro episódio), o tempo de doença ou escores nas escalas HAM-D, YMRS e CAMCOG. No único estudo que investigou a correlação entre parâmetros clínicos e a fosforilação da GSK-3B em pacientes com TB, Li e colaboradores (2007) também não encontraram correlação entre a melhora na YMRS e a concentração da fosfo-GSK-3B.

6.1 Limitações

Algumas limitações devem ser avaliadas para um melhor entendimento dos resultados deste trabalho. Em primeiro lugar, o tamanho da amostra (31 pacientes com TB e 32 controles saudáveis) limita os recursos de análise estatística que podem ser utilizados, principalmente em subamostras dentro dos grupos de pacientes com TB e assim diferenças presentes podem deixar de serem constatadas. Apesar desta importante observação, todos os outros estudos *in vivo* realizados até o momento sobre esse tema em TB lançaram mão de número reduzido de indivíduos, com a amostra de pacientes com TB somada aos controles, variando de 39 (Polter et al., 2010) a 60 (Li et al., 2010). Além disso, os cálculos do efeito e do poder estatístico do presente estudo, considerando a hipótese primária, não evidenciaram grande benefício em se aumentar a amostra atual.

A falta de homogeneidade em relação ao episódio atual de humor é outra das limitações observadas. Entretanto, a restrição do recrutamento a apenas pacientes com TB em eutimia, em nosso ambulatório, limitaria ainda

mais o tamanho amostral do estudo. Li e colaboradores (Li et al., 2010) não observaram correlação entre a forma fosforilada da GSK-3 (isoformas A e B) e parâmetros clínicos de humor, como a YMRS. No presente estudo, também não observamos correlações entre as escalas de gravidade do humor e a razão da GSK-3B ou a concentração de fosfo-GSK-3B em plaquetas de pacientes com TB.

A inclusão de pacientes com diagnóstico de demência na amostra de pacientes com TB, embora possa ser contestada, contribuiu para o aumento da amostra. Neste grupo de bipolares não observamos correlação da escala de avaliação cognitiva CAMCOG nem o diagnóstico de demência com a GSK-3B, fosfo-GSK-3B e razão da GSK-3B.

A utilização de um grupo de pacientes idosos pode limitar a generalização dos dados. No entanto, na nossa amostra não observamos a influência da idade como preditora para os resultados positivos. Uma vantagem, entretanto, de utilizar-se essa população, particularmente, nos casos de TB de início precoce decorre da possibilidade de maior especificidade diagnóstica decorrente da extensa avaliação longitudinal à qual o indivíduo submeteu-se no curso do transtorno.

A ausência de um grupo de pacientes não medicados não nos permite dizer se o aumento na GSK-3B fosforilada estaria relacionado à medicação em uso ou se é inerente à doença. Entretanto, existem tão poucos dados na literatura resultantes de estudos *in vivo* sobre a GSK-3B em pacientes com TB, que a avaliação da atividade dessa enzima, em pacientes com TB em tratamento, gera dados de grande importância para a elucidação do seu envolvimento na fisiopatologia e no tratamento desse transtorno.

A ausência de um grupo de pacientes não medicados não nos permite dizer se o aumento na GSK-3B fosforilada estaria relacionado à medicação em uso ou se é inerente à doença.

7. CONCLUSÕES

No presente estudo demonstramos que a atividade da GSK-3B está diminuída em idosos com TB medicados, em relação a controles saudáveis. A diminuição da atividade enzimática foi secundária a um aumento significativo da forma fosforilada (inativa) da GSK-3B, não acompanhada por alterações na expressão proteica total. Estudos futuros, com pacientes não medicados, serão necessários para avaliar se o aumento na GSK-3B fosforilada estaria relacionado à medicação em uso ou se é inerente à doença.

8. ANEXOS

ANEXO A

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: M F

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO: Nº: APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE: SEXO: M F

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO: Nº: APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: *A atividade da enzima gsk-3β em pacientes idosos portadores de transtorno bipolar.*
- PESQUISADOR: *Dr. Orestes Vicente Forlenza*
- CARGO/FUNÇÃO: *Orientador de Pós-Graduação e Professor Colaborador do Departamento de Psiquiatria*
- INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 65.590
- UNIDADE DO HCFMUSP: *Departamento e Instituto de Psiquiatria da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – Laboratório de Neurociência (LIM-27).*
2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:
- | | | | |
|--------------|---|-------------|---|
| RISCO MÍNIMO | = | RISCO MÉDIO | = |
| RISCO BAIXO | X | RISCO MAIOR | = |
3. DURAÇÃO DA PESQUISA : *12 meses*

1 – **Desenho do estudo e objetivo(s):** A glicogênio sintase quinase (GSK) é uma enzima presente em vários sistemas biológicos e tem sido objeto de estudos em doenças sistêmicas, processos relacionados à inflamação e também em transtornos psiquiátricos, tais como o transtorno afetivo bipolar e a depressão unipolar, esquizofrenia e de desordens neurodegenerativas, incluindo a doença de Alzheimer. A GSK-3 β é a isoforma mais abundante no organismo, altamente expressa no sistema nervoso central, e está envolvida na regulação de diversas cascatas bioquímicas necessárias para a homeostase cerebral. Apesar de evidências indiretas do envolvimento da GSK nos transtornos afetivos, até o presente, não há estudos na literatura em que abordem diretamente a relação entre tais quadros e a atividade da GSK, especialmente em pacientes idosos. O objetivo primário deste estudo é avaliar a atividade da enzima Glicogênio Sintase Quinase 3 β (GSK 3 β) em pacientes idosos portadores de Transtorno Afetivo Bipolar em fase de mania, depressão ou eutímia, em comparação com idosos sem evidência de Transtorno Afetivo Bipolar. Participarão desse estudo pacientes idosos portadores de Transtorno Bipolar em diferentes estados de humor: mania, depressão e eutímia; e idosos sem evidência de transtornos depressivos e de comprometimento cognitivo (controles). A hipótese de trabalho principal desta pesquisa é que a atividade da GSK 3 β está aumentada nos pacientes portadores de Transtorno Afetivo Bipolar nas fases maníaca e depressiva em relação aos bipolares eutímicos e sujeitos controles (não-bipolares).

2 – **Procedimentos que serão realizados, com seus propósitos e identificação dos que forem experimentais e não rotineiros:** Exame clínico, aplicação de testes para avaliação cognitiva e do estado de humor, incluindo a entrevista Clínica Estruturada para o Diagnóstico de Transtornos do EIXO I do DSM IV (SCID – I/P), Escala de Depressão de Hamilton – 21 itens (para depressão); Escala de Avaliação de Mania de Young, Entrevista semi-estruturada CAMDEX, IQCODE e Escala de Avaliação Clínica de Demência. Será realizada coleta de sangue por punção periférica da veia do antebraço para avaliação laboratorial (doseagem da atividade da GSK- β).

3 – **Relação dos procedimentos rotineiros e como são realizados:** Coleta de sangue por punção periférica da veia do antebraço para avaliação laboratorial de rotina (hemograma completo, TSH e T4 livre, eletrólitos (Na, K, Cl, Ca iônico), glicemia, VDLR, creatinina, uréia, AST, ALT, GGT, proteínas totais e frações, colesterol total e frações, vitaminas B12 e ácido fólico).

3 – **Desconfortos e riscos esperados:** Os procedimentos a serem realizados geralmente causam pouco desconforto ou apresentam risco pequeno aos pacientes.

4 – **Relação dos procedimentos rotineiros e como são realizados:** Será feita uma avaliação clínica e cognitiva (isto é, de memória, atenção e outras funções cognitivas). Profissionais envolvidos com nossa equipe perguntarão a você e ao responsável por seus cuidados as questões para completar o histórico clínico. Além disto, os pacientes coletarão sangue, através de punção venosa,

para a dosagem de substância que possam estar associadas à manifestação ou ao tratamento do transtorno bipolar.

5 - **Descrição dos desconfortos e riscos esperados:** Os desconfortos esperados correspondem à duração da avaliação clínica / cognitiva e o desconforto e risco relativo à coleta de sangue, através de punção venosa (procedimento usual para coleta de sangue para exames de rotina).

6 - **Benefícios que poderão ser obtidos:** Os pacientes que forem diagnosticados com transtorno bipolar serão tratados de acordo com o que é preconizado na literatura médica atual a cerca do assunto.

7 - **Relação de procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo:** não há

8 - **Garantia de acesso:** em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr Orestes Vicente Forlenza, que pode ser encontrado no endereço Rua Dr. Ovidio Pires Campos, 765 - Telefone: 3069-8010 - CEP: 05403-010. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) - Rua Ovidio Pires de Campos, 225 - 6º andar - tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 - E-mail: cappeso@hcnnet.usp.br.

9 - **É garantida a liberdade de retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.**

10 - **Direito de confidencialidade -** As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente.

11 - **Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores.**

12 - **Despesas e compensações:** não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

13 - **Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.**

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo: "A atividade da enzima gsk-3 β em pacientes idosos portadores de transtorno bipolar". Eu discuti com o Dr. Orestes Vicente Forlenza sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente

em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

.....

Assinatura do paciente/representante legal Data ____/____/____

.....

Assinatura da testemunha Data ____/____/____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

.....

.....

Data ____/____/____

Assinatura do responsável pelo estudo

ANEXO B



APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 03/06/2009, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0500/09**, intitulado: **"ATIVIDADE DA ENZIMA GSK-3B EM PACIENTES IDOSOS PORTADORES DE TRANSTORNO BIPOLAR"** apresentado pelo Departamento de **PSIQUIATRIA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

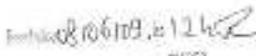
Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Dr. Orestes Vicente Fortenza**

Pesquisador (a) Executante: **Rodolfo Braga Ladeira**

CAPPesq, 03 de Junho de 2009.


Prof. Dr. Eduardo Massad
 Presidente da Comissão de
 Ética para Análise de Projetos
 de Pesquisa


 Rodolfo Braga Ladeira
 03/06/09

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovidio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo - SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6462 e-mail: cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br

1/1

9. REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS¹

Ackenheil M. Neurotransmitters and signal transduction processes in bipolar affective disorders: a synopsis. *J Affec Disord.* 2001;62:101-11.

Almeida OF, Fenner S. Bipolar disorder: similarities and differences between patients with illness onset before and after 65 years of age. *Int Psychogeriatr.* 2002;14:311-22.

American Psychiatric Association (APA). *Diagnostic and Statistic Manual of Mental Disorders.* 4th Ed, Text revision. Washington DC: American Psychiatric Association: 2000.

Barry FA; Graham GJ; Fry MJ; Gibbins JM; Regulation of glycogen synthase kinase 3 in humans platelets: a possible role in platelet function? *FEBS Letters.* 2003; 553: 173 – 8.

Bauer M, Adli M, Baethge C, Berghöfer A, Sasse J, Heinz A, et al. Lithium augmentation therapy in refractory depression: clinical evidence and neurobiological mechanisms. *Can J Psychiatry.* 2003; 48: 440-6.

Beasley C, Cotter D, Everall I. An investigation of the Wnt-signalling pathway in the prefrontal cortex in schizophrenia, bipolar disorder and major depressive disorder. *Schizophr Res.* 2002 Nov 1;58(1):63-7.

Berendsen HH. Interactions between 5-hydroxytryptamine receptor subtypes: is a disturbed receptor balance contributing to the symptomatology of depression in humans? *Pharmacol Ther.* 1995; 66: 17-37.

Bijur GN, Jope RS. Proapoptotic stimuli induce nuclear accumulation of glycogen synthase kinase-3 beta. *J Biol Chem.* 2001;276:37436–42.

Borsini F. Balance between cortical 5-HT1A and 5-HT2 receptor function: hypothesis for a faster antidepressant action. *Pharmacol Res.* 1994; 30:1-11

Bottino CMC, Almeida OP, Tamai S, Forlenza OV, Scalco MZ, Carvalho IAM. *Entrevista estruturada para diagnóstico de transtornos mentais em idosos.* São Paulo: PROTER, Instituto de Psiquiatria do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP; 1999.

Brucki SMD, Nitrini R, Caramelli P, Bertolucci PHF, Okamoto IH. Sugestões para o uso do mini-exame do estado mental no Brasil. *Arq Neuropsiquiatr.* 2003;61:777-81.

Ciani L, Salinas PC. WNTs in the vertebrate nervous system: from patterning to neuronal connectivity. *Nat Rev Neurosci.* 2005;6:351–62.

¹ De acordo com as normas de padrão Vancouver

Dale TC. Signal transduction by the Wnt family of ligands. *Biochem J*. 1998;329(Pt 2):209–23.

De Sarno P, Li X, Jope RS. Regulation of Akt and glycogen synthase kinase-3 beta phosphorylation by sodium valproate and lithium. *Neuropharmacology*. 2002 Dec;43:1158-64.

Depp CA, Jeste DV. Bipolar disorder in older adults: a critical review. *Bipolar Disord*. 2004;6:343–67

Diniz BS, Nunes PV, Yassuda MS, Pereira FS, Flaks MK, Viola LF, Radanovic M, Abreu ID, Borelli DT, Gattaz WF, Forlenza OV. Mild Cognitive Impairment: Cognitive Screening or Neuropsychological Assessment? *Rev Bras Psiquiatr* 2008; 30: 316-21.

Diniz BS, Talib LL, Giroud Joaquim HP, de Paula VR, Gattaz WF, Forlenza OV. Platelet GSK3B activity in patients with late-life depression: Marker of depressive episode severity and cognitive impairment? *World J Biol Psychiatry*. 2011;12:216-22.

Doble BW, Woodgett JR. GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *J Cell Sci* 2003; 116: 1175 – 86.

Dugo L, Collin M, Thiemermann C. Glycogen synthase kinase 3 β as a target for the therapy of shock and inflammation. *Shock* 2007; 27 (2): 113 – 23.

Embi N, Rylatt DB, Cohen P. Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle. Separation from cyclic-AMP-dependent protein kinase and phosphorylase kinase. *Eur J Biochem*. 1980; 107 (2): 519 – 27.

Erzigkeit H. The Development of the SKT Project. In I. Hindmarch H. Hippus and G. K. Wilcock, (Eds.) *Dementia: Molecules, Methods and Measures*, Pp. 101-108. 1991.

Faul F, Erdfelder E, Buchner A, Lang AG. Statistical Power analyses using G*Power 3.1: tests for correlation and regression analyses. *Behav Res Methods*. 2009; 41: 1149-60

First MB, Spitzer RL, Gibbon M, Willian JBW. *Structured Clinical Interview for DSM IV Axis I disorders – Research version – Non-patient Edition (SCID-I/NP)*. New York: Biometrics Research Department. 2002.

Folstein MF, Folstein SE, Mchugh PR. Mini-Mental State: A Practical Method for Grading the Cognitive State of Patients for the Clinician. *J Psychiatr Res* 1975; 12:189-98

Forlenza OV, Torres CA, Talib LL, de Paula VJ, Joaquim HP, Diniz BS, et al. Increased platelet GSK3B activity in patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *J Psychiatr Res*. 2011;45:220-4. Epub 2010 Jun 23.

Fradkin LG, Garriga G, Salinas PC, Thomas JB, Yu X, Zou Y. Wnt signaling in neural circuit development. *J Neurosci*. 2005;25:10376–8.

Frame S, Cohen P. GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochem J* 2001; 359: 1 – 16.

Fuentealba RA, Farias G, Scheu J, Bronfman M, Marzolo MP, Inestrosa NC. Signal transduction during amyloid β peptide neurotoxicity: role in Alzheimer's Disease. *Brain Res Brain Res Rev*. 2004; 47: 275 – 89.

Gould TD, Manji HK. The Wnt signaling pathway in bipolar disorder. *Neuroscientist* 2002;8:497–511.

Gould TD, Einat H, Bhat R, Manji HK. AR-A014418, a selective GSK-3 inhibitor, produces antidepressant-like effects in the forced swim test. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2004; 7:387-90.

Gould TD, Dow ER, O'Donnell KC, Chen G, Manji HK. Targeting signal transduction pathways in the treatment of mood disorders: recent insights into the relevance of the Wnt pathway. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2007;6:193–204.

Hachinski VC, Iliff LD, Zilhka E, Du Boulay GH, McAllister VL, Marshall J, et al. Cerebral Blood Flow in Dementia. *Arch Neurol* 1975; 32: 632-37.

Hamilton MA. Rating Scale for Depression. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1960; 23: 56-62.

Hanada M, Feng J, Hemmings BA. Structure, regulation and function of PKB/AKT – a major therapeutic target. *Biochim Biophys Acta*. 2004; 1697: 3-16.

Himmelhoch JM, Neil JF, May SJ, Fuchs CZ, Licata SM. Age, dementia, dyskinesias, and lithium response. *Am J Psychiatry*. 1980;137:941–5.

Hodkinson HM. Evaluation of a mental test score for assessment of mental impairment in the elderly. *Age Ageing*. 1972 Nov;1(4):233-8.

Hye A, Kerr F, Archer N, Foy C, Poppe M, Brown R, Hamilton G, et al. Glycogen synthase kinase 3 is increased in white cells early in Alzheimer's Disease. *Neurosci Lett*. 2005; 373: 1–4.

Joaquim HP, Talib LL, Forlenza OV, Diniz BS, Gattaz WF. Long-term sertraline treatment increases expression and decreases phosphorylation of glycogen synthase kinase-3B in platelets of patients with late-life major depression. *J Psychiatr Res*. 2012. [Epub ahead of print]

Jope RS. Lithium and GSK-3: one inhibitor, two inhibitory actions, multiple outcomes. *Trends. Pharmacol Sci.* 2003;24:441–3

Jope RS, Johnson GVW. The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3 (GSK3). *Trends Biochem Sci.* 2004; 29: 95-102.

Jope RS, Roh M. Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK3) in psychiatric diseases and therapeutic interventions. *Curr Drug Targets.* 2006; 7: 1421-34.

Jope RS, Yuskaitis CJ, Beurel E. Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK3): Inflammation, Diseases and Therapeutics. *Neurochem Res.* 2007; 32: 577 - 95.

Jorm AF, Jacomb PA. The Informant Questionnaire on Cognitive Decline in the Elderly: Sociodemographics Correlates, Reliability, Validity and Some Norms. *Psychol Med.* 1989; 19: 1015-22.

Kaidanovich-Beilin O, Milman A, Weizman A, Pick CG, Eldar-Finkelman H. Rapid antidepressive-like activity of specific glycogen synthase kinase inhibitor and its effect on β -catenin in mouse hippocampus. *Biol Psychiatry.* 2004; 55:781-84.

Kapczinski F, Frey BN, Zannatto V. Fisiopatologia do transtorno afetivo bipolar: o que mudou nos últimos 10 anos? *Rev Bras Psiquiatr.* 2004;26:17-21.

Karege F, Perroud N, Burkhardt S, Fernandez R, Ballmann E, La Harpe R, et al. Alteration in kinase activity but not in protein levels of protein kinase B and glycogen synthase kinase-3 β in ventral prefrontal cortex of depressed suicide victims. *Biol Psychiatry.* 2007; 61: 240-5.

Klein PS, Melton DA. A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996; 93: 8455 – 9.

Lesort M, Greendorfer A, Stockmeier C, Johnson GV, Jope RS. Glycogen synthase kinase-3 β , beta-catenin, and tau in postmortem bipolar brain. *J Neural Transm.* 1999;106:1217-22.

Li X, Zhu W, Roh M, Friedman AB, Rosborough K, Jope RS. In vivo regulation of glycogen synthase kinase-3 β (GSK3 β) by serotonergic activity in mouse brain. *Neuropsychopharmacology* 2004; 29: 1426-31.

Li X, Friedman AB, Zhu W, Wang L, Boswell S, May RS, et al. Lithium Regulates Glycogen Synthase Kinase-3 β in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells: Implication in the Treatment of Bipolar Disorder. *Biol Psychiatry.* 2007;61:216–22.

Li X, Liu M, Cai Z, Wang G, Li X. Regulation of glycogen synthase kinase-3 during bipolar mania treatment. *Bipolar Disord.* 2010;12:741-52

Li X, Jope RS. Is glycogen synthase kinase-3 a central modulator in mood regulation? *Neuropsychopharmacology*. 2010;35:2143-54

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951, 193(1):265-75.

Machado-Vieira R, Manji HK, Zarate Jr CA. The role of lithium in the treatment of bipolar disorder: convergent evidence for neurotrophic effects as a unifying hypothesis. *Bipolar Disord*. 2009; 11(Suppl 2): 92–109.

Machado-Vieira R, Salvadore G, DiazGranados N, Ibrahim L, Latov D, Wheeler-Castillo C, et al. New therapeutic targets for mood disorders. *ScientificWorldJournal*. 2010;10:713-26

Mai L, Jope RS, Li X. BDNF-mediated signal transduction is modulated by GSK3 β and mood stabilizing agents. *J Neurochem*. 2002;82:75–83.

Maia ALG, Godinho C, Ferreira ED. Aplicação da versão brasileira da Escala de Avaliação Clínica da Demência (Clinical Dementia Rating – CDR) em amostras de pacientes com demência. *Arq Neuropsiquiatr*. 2006; 64: 485-9.

Mendes CT, Mury FB, Moreira ES, Alberto FL, Forlenza OV, Dias-Neto E, et al. Lithium reduces GSK3 β mRNA levels: implications for Alzheimer Disease. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 2008.

Moon RT, Brown JD, Torres M. WNTs modulate cell fate and behavior during vertebrate development. *Trends Genet*. 1997;13:157–62.

Morris JC, Heyman A, Mohs RC, Hughes JP, van Belle G, Fillenbaum G, et al. The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's disease (CERAD): Part I. Clinical and neuropsychological assessment of Alzheimer's disease. *Neurology*. 1989; 39: 1159-65.

Morris JC. The Clinical Dementia Rating: current version and scoring. *Neurology*. 1993; 43: 2412-4.

Muñoz-Montaño JR, Moreno FJ, Avila J, Diaz-Nido J. Lithium inhibits Alzheimer's disease-like tau protein phosphorylation in neurons. *FEBS Lett*. 1997;411:183-8.

Nunes PV, Diniz BS, Radanovic M, Abreu ID, Borelli DT, Yassuda MS, et al. CAMCOG as a screening tool for diagnosis of Mild Cognitive Impairment and Dementia in a Brazilian clinical sample of moderate to high education. *Int J Geriatr Psychiatry*. 2008:1127-33

O'Brien TW, Klein PS. Regulation of glycogen synthase kinase-3 in patients with affective disorders. *Biol Psychiatry*. 2007; 61:139-41.

Pandey GN, Ren X, Rizavi HS, Dwivedi Y. Glycogen synthase kinase-3beta in the platelets of patients with mood disorders: effect of treatment. *J Psychiatr Res.* 2010;44:143-8.

Pang WY, Lotufo Neto L, Soares CMSM. *Entrevista clínica estruturada para transtorno do eixo I do DSM – IV*. Núcleo de Epidemiologia Psiquiátrica, Instituto de Psiquiatria do Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2005.

Pap M, Cooper GM. Role of glycogen synthase kinase-3 in the phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt cell survival pathway. *J Biol Chem.* 1998;273:19929–32.

Polter A, Beurel E, Yang S, Garner R, Song L, Miller CA, et al. Deficiency in the inhibitory serine-phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 increases sensitivity to mood disturbances. *Neuropsychopharmacology.* 2010;35:1761-74.

Regier DA, Farmer ME, Rae DS, Myers JK, Kramer M, Robins LN, et al. One-month prevalence of mental disorders in the United States and sociodemographic characteristics: the Epidemiologic Catchment Area study. *Acta Psychiatr Scand.* 1993 Jul;88(1):35-47.

Roh MS, Kang UG, Shin SY, Lee YH, Jung HY, Juhn YS, et al. Biphasic changes in the Ser-9 phosphorylation of glycogen synthase kinase-3beta after electroconvulsive shock in the rat brain. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2003; 27:1-5.

Roh MS, Eom TY, Zmijewska AA, De Sarno P, Roth KA, Jope RS. Hypoxia activates glycogen synthase kinase-3 in mouse brain in vivo: protection by mood stabilizers and imipramine. *Biol Psychiatry.* 2005 Feb 1;57(3):278-86.

Roth M, Tym E, Mountjoy CQ, Huppert FA, Hendrie H, Verma S, et al. CAMDEX: A Standardized Instrument for the Diagnosis of Mental Disorders in the Elderly with Special Reference to Early Detection of Dementia. *Br J Psychiatry.* 1986; 149:698-709.

Rowe MK, Wiest C, Chuang DM. GSK-3 as viable potential target for therapeutic intervention in bipolar disorder. *Neurosci Behavioral Rev.* 2007; 31: 920-31.

Rylatt DB, Aitken A, Bilham T, Condon GD, Embi N, Cohen P. Glycogen synthase from rabbit skeletal muscle. Amino acid sequence at the sites phosphorylated by glycogen synthase kinase-3, and extension of the N-terminal sequence containing the site phosphorylated by phosphorylase kinase. *Eur J Biochem.* 1980; 107: 529-37.

Ryves WJ, Harwood AJ. Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 by competition for magnesium. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 280:720-5.

Ryves WJ, Harwood AJ. The interaction of glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) with the cell cycle. *Prog Cell Cycle Res.* 2003; 5:489-95.

Shapira M, Licht A, Milman, Pick GC, Shohami E, Eldar-Finkelman H. Role of glycogen synthase kinase-3 β in early depressive behavior induced by mild traumatic brain injury. *Mol Cell Neurosci.* 2007; 34: 571-7.

Stambolic V, Ruel L, Woodgett JR. Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 activity and mimics wingless signalling in intact cells. *Curr Biol.* 1996 Dec 1;6(12):1664-8.

Subramaniam H, Dennis MS, Byrne EJ. The role of vascular risk factors in late onset bipolar disorder. *Int J Geriatr Psychiatry* 2007;22:733–7.

Sunderland T, Hill JL, Mellow AM, Lawlor BA, Gundersheimer J, Newhouse PA, et al. Clock Drawing in Alzheimer's Disease. A Novel Measure of Disease Severity. *J Am Geriatr Soc.* 1989; 37: 725-29.

Vasudev A, Thomas A. 'Bipolar disorder' in the elderly: what's in a name? *Maturitas.* 2010;66:231-5.

Vilela JA, Crippa JA, Del-Ben CM, Loureiro SR. Reliability and validity of a Portuguese version of the Young Mania Rating Scale. *Braz J Med Biol Res.* 2005 Sep;38(9):1429-39. Epub 2005 Aug 26.

Wechsler DI. *Examiner's Manual: Wechsler Adult Intelligence Scale-Revised.* Psychological Corporation, New York. 1981.

Wodarz A, Nusse R. Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1998;14:59–88.

Woodgett JR. Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A. *Embo J.* 1990; 9:2431–8.

World Health Organisation International (WHO). *Classification of diseases-10.* Geneva: 1992.

Yassa R, Nair NP, Iskandar H. Late-onset bipolar disorder. *Psychiatr Clin North Am.* 1988;11:117–31.

Young RC, Biggs JT, Ziegler VE, Meyer DA. A rating scale for mania: reliability, validity and sensitivity. *Br J Psychiatry.* 1978;133:429-35.