

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

CARINE HARTMANN DO PRADO

**ANÁLISE DE PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS EM
MULHERES COM TRANSTORNO BIPOLAR TIPO I
EUTÍMICAS**

PORTO ALEGRE, 2012

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**ANÁLISE DE PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS EM
MULHERES COM TRANSTORNO BIPOLAR TIPO I,
EUTÍMICAS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul como requisito para obtenção do grau de Mestre.

Autor

Carine Hartmann do Prado

Orientador

Prof. Dr. Moisés Evandro Bauer

PORTO ALEGRE, 2012

*Dedico esta dissertação aos meus pais,
pelo constante apoio, incentivo e compreensão.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus amigos que, de uma forma ou de outra, contribuíram com sua amizade e com sugestões efetivas para a realização deste trabalho, gostaria de expressar minha profunda gratidão.

Um agradecimento especial aos meus pais, Rose e Tarciso, a quem dedico esta dissertação. O apoio, dedicação e carinho foram essenciais ao longo desta trajetória de dois anos, bem como durante todo o meu percurso acadêmico. Sem o seu apoio emocional e sacrifício dificilmente teria sido possível chegar até aqui.

Gostaria de agradecer intensamente ao professor Dr. Moisés Evandro Bauer pela competência com que orientou a minha dissertação e o tempo que me dedicou transmitindo-me os mais úteis ensinamentos. Agradeço pela oportunidade, confiança, ensinamentos e por me permitir percorrer meus próprios caminhos no decorrer dessa trajetória, que foram fundamentais para o sucesso deste trabalho.

Ao meu colega e amigo Lucas Rizzo, por esta parceria que deu muito certo. Agradeço muito a ele, principalmente pela amizade, paciência, carinho e ajuda em todos os experimentos realizados durante a pesquisa. Sua ajuda foi essencial para o desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

À Andréa Wieck, minha colega de mestrado e, sobretudo uma grande amiga, pelo zelo, conforto, incentivo, sugestões e principalmente por tornarem melhores os momentos de trabalho. Outro agradecimento também para o amigo Rafael Czepielewski, pela disposição com que me ajudou inúmeras vezes com as análises de citometria e realização da quantificação de citocinas.

Aos demais colegas da pesquisa: Talita Siara, Priscila Salvato, Taiane Garcia, Bruna Luz e Thiago Borges. Obrigada pelo carinho, paciência e apoio durante todo o mestrado.

RESUMO

O Transtorno Bipolar (TB) é uma doença psiquiátrica crônica, complexa e multifatorial, caracterizada por ciclos alternados de mania e depressão, intercalados com períodos de remissão ou eutímia. Diversos estudos vêm demonstrando associações entre sistema nervoso, endócrino e imunológico na patofisiologia do TB. Uma ativação imune, evidenciada por níveis plasmáticos aumentados de citocinas pró-inflamatórias, tem sido frequentemente relatada no TB. No entanto, a maioria dos estudos refere-se principalmente às fases de mania e depressão, e poucos estudos foram desenvolvidos na fase de eutímia. Neste estudo, investigamos mecanismos celulares e moleculares potencialmente envolvidos no fenômeno inflamatório no TB, incluindo diversos subtipos linfocitários e vias intracelulares de ativação linfocitária. Vinte e sete pacientes mulheres com TB I eutímicos e 24 controles saudáveis pareados por sexo e idade foram recrutadas neste estudo. Os linfócitos foram isolados e estimulados *in vitro* para avaliar as citocinas Th1/Th17/Th2 (IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-17, IFN- γ e TNF- α) e expressão de proteínas cinases ativadas por mitógeno (MAPKs). A expressão das MAPKs (p-ERK e p-p38), subtipos linfocitários e citocinas foram avaliados por citometria de fluxo. Todas as citocinas avaliadas encontraram-se elevadas nos bipolares em comparação com controles saudáveis. Em particular, foi evidenciado um viés para um perfil Th1 (inflamatório) no TB I. Interessantemente, observamos uma redução significativa (-56%) de células T regulatórias (CD4+CD25+Foxp3+) e expansão (43%) de células T CD8+ regulatórias (CD8+CD28-) no TB. Os linfócitos dos pacientes bipolares apresentaram um aumento significativo de p-ERK em relação a p-p38, indicando uma ativação linfocitária. Concluindo, nossos dados sugerem que múltiplos mecanismos celulares e moleculares contribuem para um desequilíbrio imune observado no TB.

Palavras-chave: transtorno bipolar; linfócitos; citometria de fluxo; citocinas; inflamação.

ABSTRACT

Bipolar Disorder (BD) is a complex, multifactorial and chronic psychiatric illness. It is characterized by alternating cycles of mania and depression, with periods of remission or euthymia. Several studies have suggested a direct interaction between nervous, endocrine and immune systems in the pathophysiology of BD. An immune activation, as evidenced by increased plasma levels of proinflammatory cytokines, has been frequently reported in BD. However, the majority of the studies have mainly investigated mania and depression phases, and very few studies have been developed with euthymic patients. In this study, we investigated cellular and molecular mechanisms potentially involved in the inflammatory process in BD, including various lymphocytes subtypes and intracellular pathways of lymphocyte activation. Twenty-seven euthymic female subjects with BD type I and 24 age- and sex-matched controls were recruited in this study. Lymphocytes were isolated and stimulated *in vitro* to assess Th1/Th17/Th2 cytokines (IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-17, IFN- γ and TNF- α) and expression of mitogen-activated protein kinases (MAPKs). The expression of MAPKs (p-oERK and p38), lymphocyte subtypes and cytokines were assessed by flow cytometry. All cytokines assessed were found elevated in bipolar disorder compared with healthy controls. In particular, it was evidenced a bias to a Th1 inflammatory profile in BD. Interestingly, we observed a significant reduction (-56%) of regulatory T cells (CD4+CD25+Foxp3+) and expansion (43%) of CD8+ regulatory T cells (CD8+CD28-) in BD. The lymphocytes of BD patients showed an significant increase in p-ERK in relation to p-p38, indicating lymphocyte activation. Our data suggest that multiple molecular and cellular mechanisms contribute to the immunological imbalance observed in BD.

Keywords: bipolar disorder; lymphocytes; flow cytometry; cytokines; inflammation

SUMÁRIO

1. CAPÍTULO 1.....	1
1.1. INTRODUÇÃO	2
1.1.1. <i>Descrição Clínica do Transtorno Bipolar</i>	2
1.1.2. <i>Fisiopatologia</i>	3
1.1.3. <i>Alterações imunológicas no Transtorno Bipolar</i>	5
1.1.3.1. Alterações nas citocinas	6
1.1.3.2. Alterações celulares	7
1.1.3.3. Alterações na sinalização celular - MAPKs	8
1.2. OBJETIVOS	10
1.2.1. <i>Objetivo Geral</i>	10
1.2.2. <i>Objetivos Específicos</i>	10
2. CAPÍTULO 2.....	11
2.1. ARTIGO CIENTÍFICO	12
3. CAPÍTULO 3.....	35
3.1. CONSIDERAÇÕES FINAIS	36
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

1. CAPÍTULO 1

1.1. INTRODUÇÃO

1.1.1. Descrição Clínica do Transtorno Bipolar

O Transtorno Bipolar é um transtorno mental que se caracteriza por ciclos alternados de mania (extrema elevação do humor) e depressão, intercalados ou não por períodos de remissão ou eutímia (Kim, Rapoport *et al.*, 2010; Kupferschmidt e Zakzanis, 2011). A eutímia é definida como o indivíduo que não está em episódio atual de humor e que não apresenta sintomas significativos de mania ou depressão. Usualmente, a eutímia é do ponto de vista operacional, definida como não preencher critérios para episódio maníaco, hipomaníaco ou depressivo atual. Já a remissão implica no indivíduo manter a eutímia, a ponto de a doença ser considerada sob controle. O TB é classificado de acordo com o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais, 4ª edição (DSM-IV). Existem duas formas distintas de TB: o tipo I e tipo II. O TB tipo I (transtorno bipolar clássico) é caracterizado pela ocorrência de um ou mais episódios maníacos ou episódios mistos. O TB tipo II inclui ao menos um episódio de hipomania (uma forma menos grave de mania) e para o diagnóstico correto do TB II é exigida a ausência de episódios maníacos ou mistos. Ambos os pacientes com TB tipo I e tipo II podem apresentar episódios depressivos ao longo do curso do transtorno (Provencher, Hawke *et al.*, 2011). Os episódios são de diferente gravidade, frequência e duração, e o episódio misto ocorre quando o paciente preenche simultaneamente os critérios diagnósticos para episódio maníaco e episódio depressivo (Benazzi, 2007). A incidência do TB é de cerca de 1 a 5 % na população mundial (Vermani, Marcus *et al.*, 2011). A prevalência do TB tipo I é estimada na faixa de 1%, e não há diferenças entre o sexo masculino e feminino. Já o TB tipo II é mais prevalente no sexo feminino, afetando entre 0,5- 3% (Bauer e Pfennig, 2005; Kessler, Merikangas *et al.*, 2007).

Os indivíduos com TB possuem um risco estimado de suicídio em 15%, e este risco aumenta consideravelmente durante a fase depressiva da doença (Baldassano, Hosey *et al.*, 2011). Tal transtorno, crônico e em boa parte incapacitante, é altamente relevante devido ao prejuízo associado a esta condição, não somente aos pacientes, mas também aos familiares e cuidadores. Além dos sintomas de depressão, mania (ou hipomania) e o risco de suicídio, os pacientes com TB enfrentam múltiplas comorbidades psiquiátricas e físicas, como o transtorno de ansiedade, altas taxas de suicídio, abuso de substâncias, obesidade, diabetes tipo II, do-

enças cardiovasculares, entre outras (Degenhardt, Gatz *et al.*, 2011; Provencher, Hawke *et al.*, 2011).

O diagnóstico do TB inclui alterações de humor, com uma sintomatologia complexa e de etiologia multifatorial, na qual fatores biológicos e psicossociais interagem em diversos níveis. Mesmo tendo sido descrito há longo tempo, ainda existem casos em que o TB não é diagnosticado em tempo hábil para um tratamento adequado ou mesmo de forma correta, sendo comum um diagnóstico inicial de depressão unipolar ou esquizofrenia (Gonzalez-Pinto, Gutierrez *et al.*, 1998). O diagnóstico exato e avaliação do TB são essenciais para a tomada de decisões clínicas e a determinação de prognóstico e tratamentos. Para muitos pacientes, um episódio inicial de mania ou depressão evolui para uma doença ao longo da vida. Portanto para evitar a recorrência, o comportamento suicida e a cronicidade, o tratamento farmacológico em longo prazo é indicado no início do curso da doença.

O tratamento de indivíduos com TB envolve estratégias distintas nas diferentes fases da doença: mania, depressão e eutimia, e objetiva a manutenção das mudanças de humor e a redução da frequência das passagens entre as crises de mania e os estados depressivos. Uma variedade de medicamento são atualmente aprovadas pelo *Food and Drug Administration* (FDA), a agência americana responsável pelo controle de medicamentos e alimentos, incluindo o lítio, carbamazepina e ácido valpróico, além de anticonvulsivantes e antipsicóticos atípicos (Jamrozinski, Gruber *et al.*, 2009; Offord, 2011). Para o tratamento de mania, é utilizado o lítio, carbamazepina e clorpromazina, juntamente com os antipsicóticos atípicos. Para a fase depressiva da doença, foram aprovados apenas a combinação olanzapina-fluoxetina e a quetiapina (Sanches e Soares, 2011). Existe considerável controvérsia sobre o uso de antidepressivos em pacientes bipolares, não apenas pelo aumento no risco de indução de mania, mas também devido à sua eficácia questionável. Os estabilizadores de humor são compostos utilizados muitas vezes com antidepressivos para manter a eutimia em pacientes e evitar um episódio de mania ou depressão.

1.1.2. Fisiopatologia

O TB é uma doença complexa, multifatorial, e diversos modelos etiológicos tentam explicar o surgimento e a manifestação dos sintomas característicos desta doença. Embora o conhecimento da patofisiologia do TB seja ainda bastante limitado, existem evidências de que

múltiplos sistemas biológicos estão envolvidos, especialmente o sistema nervoso central, sistema endócrino e sistema imunológico (Kupka, Breunis *et al.*, 2002; Knijff, Breunis *et al.*, 2006). Com o intuito de manter o equilíbrio homeostático do organismo, componentes do sistema imune interagem com o sistema neuroendócrino atuando em vias específicas envolvidos diretamente com o humor, energia e atividade motora, podendo resultar em alterações comportamentais. Independente de sua etiologia, as reações inflamatórias crônicas observadas em indivíduos com transtornos de humor (depressão maior e transtorno bipolar) podem resultar em prejuízos biológicos e contribuir para o agravamento da doença e manifestação de morbidades médicas associadas ao TB.

Por mais de três décadas, as bases biológicas dos transtornos de humor têm sido explicadas por meio da hipótese monoaminérgica. Essa teoria propõe que os sintomas psiquiátricos sejam consequência de uma menor disponibilidade de aminas biogênicas cerebrais, em particular de serotonina, noradrenalina e/ou dopamina (Capuron, Lucile *et al.*, 2011). Tal proposição é reforçada pelo conhecimento do mecanismo de ação dos antidepressivos, que se baseia, principalmente, no aumento da disponibilidade desses neurotransmissores na fenda sináptica, seja pela inibição (seletiva ou não) de suas recaptações, seja pela inibição da enzima responsável por suas degradações (inibidores da monoaminoxidase).

Neurotransmissores, hormônios e citocinas atuam através do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), formando um circuito de regulação que mantém a homeostase do organismo. Em pacientes com TB, o funcionamento do eixo HPA e do sistema imunológico parece estar comprometido (Watson, Gallagher *et al.*, 2004; Daban, Vieta *et al.*, 2005). Entre os marcadores neurobiológicos que estão relacionados à patofisiologia do TB, as citocinas inflamatórias e as neurotrofinas como o BDNF (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*) destacam-se como moléculas-chaves envolvidas em potenciais mecanismos de neurodegeneração e comprometimento cognitivo (Kauer-Sant'anna, Kapczinski *et al.*, 2009).

Estudos relatam que fatores que influenciam negativamente o curso do TB, como por exemplo, estresse e o trauma, estão associados com uma diminuição nos níveis séricos de BDNF (Kauer-Sant'anna, Kapczinski *et al.*, 2009; Shalev, Lerer *et al.*, 2009). Além disso, fatores genéticos tais como o polimorfismo no gene Val66Met, que altera os níveis de expressão de BDNF (Fan e Sklar, 2008; Vinberg, Trajkovska *et al.*, 2009) e genes relacionados ao sistema de neurotransmissores, como a serotonina (SLC6A4 e TPH2), dopamina (DRD4 e SLC6A3) e glutamato (DAOA e DTNBP1) tem sido relacionados com a patofisiologia do TB

(Serretti, Lattuada *et al.*, 2000). Por ser uma doença multifatorial, diversos estudos em áreas distintas têm sido conduzidos, com o objetivo de compreender quais mecanismos biológicos estão envolvidos na patogênese deste transtorno.

1.1.3. Alterações imunológicas no Transtorno Bipolar

O TB é o menos estudado imunologicamente dentre os principais tipos de transtornos de humor. A dificuldade de estudá-lo reside no fato da bipolaridade estar associada com alterações imunes diferenciais ao longo dos ciclos de mania e depressão (Abeer, El-Sayed *et al.*, 2006). Existem algumas evidências sugerindo de que o sistema imune, em interação direta com o sistema nervoso central, possui papel importante na patofisiologia do TB (Padmos, Bekris *et al.*, 2004; Ortiz-Dominguez, Hernandez *et al.*, 2007). Citocinas podem exercer profundos efeitos no SNC e no sistema endócrino alterando o metabolismo central das monoaminas, que são moléculas sintetizadas no cérebro a partir de seus aminoácidos precursores triptofano e tirosina (Raison, Capuron *et al.*, 2006; Brietzke, Stertz *et al.*, 2009). As modificações comportamentais induzidas pelas citocinas estão associadas a alterações no metabolismo da serotonina, norepinefrina e dopamina em regiões do cérebro essenciais para regulação das emoções e da função psicomotora. Marcadores inflamatórios como IL-1, IL-6 e INF-alfa podem alterar vias enzimáticas associadas com o metabolismo das monoaminas, como a **IDO** (indolamina-2,3-dioxigenase). Quando ativada, a IDO é capaz de metabolizar o triptofano em quinurenina, resultando na diminuição da síntese de serotonina. Curiosamente, pacientes infectados pelo vírus da hepatite C submetidos a terapia com INF-alfa apresentaram uma diminuição nos níveis de triptofano e aumento de quinurenina, concomitantes com o desenvolvimento de sintomas depressivos (Raison, Capuron *et al.*, 2006). Citocinas podem ainda induzir a liberação de glutamato por astrócitos e reduzir a expressão de transportadores de glutamato, reduzindo a recaptação glutamatérgica. O glutamato liberado por astrócitos tem acesso preferencialmente a receptores extrasinápticos NMDA (N-metil D-Aspartato) que irão reduzir a expressão de BDNF e suporte neurotrófico, e conseqüentemente aumentar a susceptibilidade neuronal ao estresse oxidativo (Miller, Maletic *et al.*, 2009).

O TB é acompanhado de múltiplos sinais de ativação e alterações do sistema imunológico (Kupka, Breunis *et al.*, 2002), variando de acordo com a fase em que o paciente se encontra (mania, depressão ou eutimia) (Ortiz-Dominguez, Hernandez *et al.*, 2007). No entanto,

a grande maioria dos estudos foca em alterações imunes presentes nas fases de mania e depressão, e poucos estudos associam estas alterações a pacientes eutímicos.

1.1.3.1. Alterações nas citocinas

Nos transtornos de humor de uma forma geral é observado um aumento de citocinas pró-inflamatórias plasmáticas e hiperatividade de linfócitos do tipo Th1 (Brietzke e Kapczinski, 2008; Kim, Rapoport *et al.*). Em indivíduos bipolares, alguns estudos sugerem que tanto os episódios maníacos quanto depressivos podem estar associados a um perfil pró-inflamatório. Porém, alterações de caráter imunológico em pacientes eutímicos também são encontradas (Rapoport, 1994).

Estudos recentes têm sugerido aumento da resposta inflamatória na patogênese do TB. As células do sistema imune secretam uma variedade de citocinas responsáveis por promover reações inflamatórias e tendem a estimular ou ativar células imunocompetentes. Com base na produção de citocinas, as células T CD4+ naive podem diferenciar tradicionalmente em Th1, Th2 e Th17 (Akdis et al, 2011; Bettelli et al, 2008). Sabe-se que a resposta linfocitária do tipo Th1 (pró-inflamatória) é responsável pela produção de interleucina-2 (IL-2), IL-6, fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e interferon- γ (IFN- γ), enquanto que as células Th2 (anti-inflamatória) secretam as citocinas IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 (Raison, Capuron *et al.*, 2006). As células Th17 protegem contra bactérias e fungos através da ativação de macrófagos via citocina pró-inflamatória IL-17. Em um estudo que avaliou os níveis de IL-17 em indivíduos bipolares e controles saudáveis, não foi observada diferença estatística nos níveis de IL-17 entre os grupos.

O aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias tais como IL-6, IFN- γ (Kim, Myint *et al.*, 2004), TNF- α (O'brien, Scully *et al.*, 2006; Kim, Rapoport *et al.*), IL-2 (Brietzke, Stertz *et al.*, 2009) e receptor solúvel IL-6 (sIL-6R) (Guloksuz, Aktas Cetin *et al.*) foram relatados em indivíduos durante episódios maníacos. Da mesma forma, os níveis plasmáticos do receptor solúvel TNF- α (sTNF-RI) estão elevados em pacientes bipolares em comparação com controles saudáveis (Hope, Melle *et al.*, 2009). Em contrapartida, alguns estudos têm proposto uma diminuição dos níveis de IL-1 e IL-2 em pacientes na fase maníaca da doença (Ortiz-Dominguez, Hernandez *et al.*, 2007). Além disso, estudos indicam um aumento significativo dos níveis de IL-4 de pacientes em episódio de mania (Kim, Myint *et al.*, 2004; Ortiz-

Dominguez, Hernandez *et al.*, 2007), indicando possivelmente uma resposta homeostática na inibição da resposta inflamatória crônica nesta doença.

Os episódios depressivos têm sido associados com um aumento nos níveis de IL-6 (O'brien, Scully *et al.*, 2006; Ortiz-Dominguez, Hernandez *et al.*, 2007) e TNF- α (O'brien, Scully *et al.*, 2006; Ortiz-Dominguez, Hernandez *et al.*, 2007). Além disso, os níveis séricos do sIL-2R foram encontrados elevados em pacientes bipolares quando comparados com indivíduos sem transtorno de humor, e o mesmo ocorreu quando comparando indivíduos maníacos com depressivos (Breunis, Kupka *et al.*, 2003).

O equilíbrio entre citocinas pró- e anti-inflamatórias é essencial para manter a homeostase no sistema. Dados existentes na literatura afirmam que o desequilíbrio entre Th1/Th2 pode estar associado com a patofisiologia do TB, mais precisamente com a fase maníaca da doença (Kim, Myint *et al.*, 2004). Ainda, este desequilíbrio poderia ser consequente de alterações na proporção dos principais subtipos celulares que secretam estas citocinas. Deve ser ressaltado, no entanto, que os estudos anteriores focaram suas pesquisas com amostras de plasma/soro que impossibilitam a identificação dos tipos celulares produtores das citocinas.

1.1.3.2. Alterações celulares

Poucos estudos investigaram as alterações celulares no TB. Em estudos realizados por Breunis e colaboradores (2003), a porcentagem de células T ativadas (CD3+HLADR+, CD3+CD25+ e CD3+CD71+) e células B (CD19+CD20+) em pacientes bipolares foram maiores em comparação com indivíduos controles (Breunis, Kupka *et al.*, 2003), apoiando o estado inflamatório observado nesta doença. Foi especulado que o estado de ativação celular e perfil inflamatório observados no TB poderiam ser consequentes de uma falta de regulação imunológica adequada. Dentre as várias vias de regulação, destacam-se as células T regulatórias naturais (Tregs). As Tregs são produzidas no timo, apresentam um fenótipo CD4+CD25+Foxp3+ e constituem um subgrupo especializado de células T com função importante na supressão de respostas autoimunes, alergias e indução de câncer (Sakaguchi, Yamaguchi *et al.*, 2008). Dessa forma, as células Tregs são indispensáveis para manter o equilíbrio homeostático do organismo, e disfunções neste subtipo podem acarretar em desordens imunológicas, como as doenças crônico-inflamatórias. Contudo, um estudo recente não verificou alteração nestas células em pacientes com TB I quando comparados com controles

saudáveis (Drexhage, Hoogenboezem *et al.*, 2011). Estudos recentes demonstram que a população de células Tregs em indivíduos com depressão maior está significativamente diminuída quando comparados com controles saudáveis (Li, Xiao *et al.*, 2010; Chen, Jiang *et al.*, 2011).

Como acontece com qualquer sistema do organismo, o sistema imunológico exhibe mudanças características com o avanço da idade. A reestruturação do sistema imune durante o envelhecimento é referida como imunossenescência, tornando o indivíduo mais susceptível às inflamações sistêmicas persistentes e patologias associadas com o envelhecimento, como o diabetes tipo II, doenças cardiovasculares, depressão maior, entre outras. Em comparação com adultos mais jovens, o sistema imune dos idosos é marcado por uma série de características, tais como: a redução do número e função de células-tronco hematopoiéticas, involução tímica, redução de células T *naive* circulantes, expansão de células T CD8+CD28- (também regulatórias), aumento nos níveis de citocinas inflamatórias, incluindo interleucina-6 (IL-6) e TNF- α , e redução das taxas CD4/CD8 (Deeks, 2011). O envelhecimento tem sido associado com um aumento nos níveis de citocinas pró-inflamatórias, ativação do eixo HPA (aumento de cortisol e redução de DHEA) e redução da sensibilidade linfocitária aos glicocorticóides (Bauer, 2008).

Estudos com depressão maior vêm sugerindo uma relação entre transtornos de humor e um envelhecimento precoce do sistema imune (Heuser, 2002; Brown, Varghese *et al.*, 2004; Evans, Charney *et al.*, 2005). Por exemplo, foi demonstrado um encurtamento da região telomérica de células mononucleares (linfócitos e monócitos) neste transtorno (Wolkowitz, Mellon *et al.*, 2011), uma alteração comum em células senescentes ou de idosos. Recentemente um estudo também observou o encurtamento telomérico no TB (Elvsashagen, Vera *et al.*, 2011). No entanto, os estudos direcionados até o momento à imunossenescência não avaliaram características imunes, como por exemplo, subtipos linfocitários associados ao processo de envelhecimento.

1.1.3.3. Alterações na sinalização celular - MAPKs

As células reconhecem e respondem ao estímulo extracelular através de vias intracelulares específicas, tais como a cascata de sinalização que leva à ativação de MAPKs (*mitogen-activated protein kinases*). As MAPKs são uma família de serina-treonina cinases, ativas por

fosforilação, responsáveis por coordenar diversas atividades celulares, como proliferação celular, diferenciação, sobrevivência e apoptose (Raman, Chen *et al.*, 2007; Kim e Choi, 2010). As três principais MAPKS identificadas são as cinases reguladas por sinal extracelular (ERK 1/2), quinase c-Jun N-terminal (JNK 1/2) e a p38. Todas as vias operam em forma de cascata: uma MAP cinase cinase cinase (MAP3K) ativa, por fosforilação, uma MAP cinase cinase (MAP2K) que, por sua vez, fosforila e ativa a MAP cinase (MAPK) (Raman, Chen *et al.*, 2007; Krishna e Narang, 2008; Furler e Uittenbogaart, 2010; Sosa, Avivar-Valderas *et al.*, 2011).

As MAPKs podem ser ativadas por uma variedade de diferentes estímulos. A ERK1/2 é ativada preferencialmente em resposta a fatores de crescimento, citocinas, soro, estresse, entre outros (Krishna e Narang, 2008; Sosa, Avivar-Valderas *et al.*, 2011). A ativação da ERK1/2 tem sido apontada como um regulador chave em processos de proliferação celular, diferenciação e sobrevivência (Roux e Blenis, 2004; Raman, Chen *et al.*, 2007). Assim, inibidores da via ERK são considerados fortes candidatos para o desenvolvimento de agentes anti-câncer. A via de sinalização p38 é ativada por uma ampla variedade de eventos estressores, tais como citocinas pró-inflamatórias (ex. TNF- α), estresse oxidativo, lipopolissacarídeo (LPS), radiação UV, entre outros. A ativação de p38 está associada principalmente com processos de inflamação, anergia e apoptose (Raman, Chen *et al.*, 2007; Krishna e Narang, 2008). Tendo em vista as respostas celulares de cada MAPK, pode-se considerar que estas duas vias de ativação, ERK1/2 e p38 possuem atividades opostas, como de proliferação e anergia, respectivamente.

1.2. OBJETIVOS

1.2.1. Objetivo Geral

Avaliar marcadores imunológicos celulares e moleculares envolvidos no processo inflamatório no TB I.

1.2.2. Objetivos Específicos

- Identificar por citometria de fluxo os principais subtipos linfocitários no sangue periférico.
- Avaliar a produção linfocitária de citocinas Th1/Th2/Th17 *in vitro*.
- Avaliar a expressão linfocitária intracelular das enzimas MAPK fosforiladas.
- Comparar todas as variáveis imunológicas com um grupo controle.

2. CAPÍTULO 2

2.1. ARTIGO CIENTÍFICO

Submetido ao Biological Psychiatry

**REDUCED REGULATORY T CELLS ARE ASSOCIATED WITH
HIGHER LEVELS OF TH1/TH17 CYTOKINES AND ACTIVATED
MAPK IN TYPE 1 BIPOLAR DISORDER**

Carine Hartmann do Prado¹, Lucas Bortolotto Rizzo, Andréa Wieck, Rodrigo Pestana Lopes, Antonio L. Teixeira, Rodrigo Grassi-Oliveira and Moisés Evandro Bauer

Laboratory of Immunosenescence, Institute of Biomedical Research (CHP, LBR, AW, MEB), Pontifical Catholic University of the Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, Brazil; Faculty of Biosciences (MEB), PUCRS, Porto Alegre, Brazil; Faculty of Psychology (RG-O), PUCRS, Porto Alegre, Brazil; BD Biosciences (RPL), São Paulo, Brazil; and Department of Internal Medicine (ALT), School of Medicine, UFMG, Belo Horizonte, Brazil.

Correspondent author: Moisés E. Bauer, PhD, Instituto de Pesquisas Biomédicas, Hospital São Lucas da PUCRS, Av. Ipiranga 6690, 2º andar. P.O. Box 1429. Porto Alegre, RS 90.610-000, Brazil. Email: mebauer@pucrs.br

¹ Carine Hartmann do Prado and Lucas Bortolotto Rizzo contributed equally to this work.

ABSTRACT

Background: Bipolar Disorder (BD) has been associated with an immunologic imbalance shown by increased peripheral inflammatory markers. The underlying mechanisms of this phenomenon may include changes in circulating cells and differential activation of mitogen-activated protein kinases (MAPKs). **Methods:** Twenty-seven euthymic female subjects with BD type I and 24 age- and sex-matched controls were recruited in this study. Lymphocytes were isolated and stimulated *in vitro* to assess Th1/Th17/Th2 cytokines (IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-17, IFN- γ and TNF- α) and MAPK phosphorylation. The expression of phospho-MAPKs, a large panel of lymphocyte subsets and cytokines were assessed by multi-color flow cytometry. **Results:** BD patients had reduced proportions of natural T regulatory cells (CD4+CD25+FoxP3+) ($p < 0.01$) in parallel to higher cytokine production (all $p < 0.01$) than healthy controls. In particular, BD was associated with a strong bias to Th1 rather than Th2 profile. There was an expansion of senescence-associated cells (CD8+CD28-) in BD ($p < 0.0001$). T cells of BD patients showed an increased p-ERK signaling in relation to p-p38 ($p < 0.0001$), indicating lymphocyte activation. **Conclusions:** Our data suggest that multiple molecular and cellular mechanisms may contribute to the immunologic imbalance observed in BD. In addition, our data concur to an early senescence process in these patients.

Introduction

There is increasing evidence suggesting that the immune and inflammatory systems play important roles in the pathogenesis of Bipolar Disorder (BD) (1). Several studies have investigated the potential role of cytokines in psychiatric disorders, based on their important actions in modulating metabolism of central neurotransmitters, hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis and neurotrophic support (2). It has been observed increased plasma levels of pro-inflammatory cytokines during BD manic episodes, including higher levels of IL-6, IFN- γ , TNF- α , IL-2 and serum soluble IL-6 receptor (sIL-6R) (3-7). We have recently observed that BD patients in mania had higher sTNFR1 levels than euthymic BD patients and controls (4). In addition, some studies also reported elevated IL-4 levels (a Th2 cytokine) in patients with manic episodes (6, 8). Similar to mania, increased levels of IL-6 and TNF- α were also observed during depressive episodes (6-8). It should be noted that previous studies assessed inflammatory markers in plasma/serum samples. The analysis of biomarkers in cellular supernatants has advantage to serum/plasma sampling as it can precise the cellular source of cytokines. The underlying mechanisms of this immunologic imbalance in BD are largely unknown and may include changes in circulating lymphocytes and the differential expression of intracellular signaling cascades.

Changes in circulating leukocytes may contribute to the immunologic imbalance observed in BD. The analyses of lymphocyte subsets, particularly T, B and NK cells are very scarce in BD though. It has been observed increased percentage of activated T cells (i.e. CD3+MHCII+; CD3+CD25+ and CD3+CD71+) and B cells (CD19+CD20+) in BD compared to healthy controls (9). This activation state could be theoretically due to a lack of peripheral regulatory cells. A recent study did not observe changes in regulatory T cells (Tregs) in BD patients as compared to controls (10). Tregs (CD4+CD25+Foxp3+) play key roles in suppressing excessive or misguided immune responses that can be harmful to the host. In particular, they are responsible for turning off immune responses against self-antigens in autoimmune diseases, allergies or commensal microbes in certain inflammatory diseases (11). To date, the roles of CD8+ regulatory T cells (CD8+CD28- and CD8+CD103+) in BD are largely unknown.

The immunologic imbalance observed in BD could be also explained by the differential expression of intracellular signaling cascades. Mitogen-activated protein kinases

(MAPKs) are important intracellular signal transduction systems and participate in a series of physiological and pathological processes, including cell growth, differentiation and apoptosis(12, 13). Three major MAPK cascades are known, including the extracellular signal-regulated protein kinase (ERK), c-jun amino-terminal protein kinase/stress-activated protein kinase (JNK/SAPK) and p-38. Of note, ERK is associated with cell proliferation, differentiation and survival, while p38 is often linked to inflammation, anergy, apoptosis and immunoregulatory actions (14, 15). Interestingly, these two enzymes have reciprocal antagonistic actions. There is no information regarding the expression of intracellular signaling transduction systems in BD.

Here, we assessed the cellular and molecular mechanisms that may influence the inflammatory state observed in BD. Specifically, we determined (a) Th1/Th2/Th17 cytokines in supernatants and addressed the role of (b) regulatory T cells and various lymphocyte subsets, as well as (c) the intracellular expression of different activated MAPKs (p38 and ERK) in euthymic type 1 BD patients and healthy controls.

Materials and methods

Subjects

Twenty-seven euthymic female subjects with BD type I were recruited at the Psychiatric Clinic of the Presidente Vargas Hospital, Porto Alegre, Brazil. Age- and sex-matched healthy controls also took part in this study. All subjects provided their written informed consent before inclusion in the study approved by the Ethical Committee of the institution. The BD type 1 diagnosis was based on clinical interview and confirmed with the *Structured Clinical Interview for DMS-IV-Axis I Disorder* (SCID-I) administered by an expert and well-trained psychiatrist. Severity of depressive and maniac symptoms were assessed by the *Hamilton Depression Rating Scale* (HDRS) and the *Young Mania Rating Scale* (YMRS), respectively. All patients were euthymic at the time of blood collection, euthymia was defined by YMRS and HDRS scores < 8 (16). Exclusion criteria to both patients and controls included: a) Presence of major axis I psychiatric disorder such as psychotic disorder, mood disorder (for control group), anxiety disorder or substance related disorder according to SCID-I; b) history of a severe medical illness; c) history of brain injury; d) presence of systemic diseases (including hypertension, inflammatory diseases, such as rheumatoid arthritis or infection) or neuro-

logical disorder, e) use of any substance that may induce immunological or endocrinological changes (exception of psychopharmacotherapy for BD patients), or f) do not agree to participate in the study.

Blood collection and cell isolation

Twenty milliliters of peripheral blood were collected by venipuncture between 12:00 and 14:00 PM and stored in EDTA tubes prior to analyses. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated density gradient under centrifugation for 30 min at 900 g. Cells were counted by means of microscopy (100 x) and viability always exceeded 95%, as judged from their ability to exclude Trypan Blue (Sigma). PBMCs were resuspended complete culture medium (RPMI-1640, supplemented with 0.5% gentamicine, 1% glutamine, 1% hepes, 0.1% fungizone, and 10% fetal calf serum, FCS; all from Sigma) and adjusted to yield a final concentration of 2×10^5 cells/well.

Immunophenotyping

A large panel of lymphocyte subpopulations was identified by multi-color flow cytometry. Briefly, PBMCs were washed in flow cytometry buffer (PBS containing 1% FCS and 0.01% sodium azide) and treated with Fc Block solution for 20 min. In order to evaluate specific lymphocyte subsets, cells were stained for 30 min with combinations of the following monoclonal antibodies: anti-CD3 FITC, anti-CD3PECy5, anti-CD4 PE, anti-CD4 FITC, anti-CD8 PE, anti-CD19 PE, anti-CD56 FITC, anti-CD28 FITC, anti-CD45RO FITC, anti-CD69 FITC, anti-FOXP3 PECy5, anti-CD103 FITC, anti-CCR7 Cy7, anti-CD45RA FITC (all from BD Biosciences, San José, CA, USA). Immediately after staining, cells were washed, resuspended and analyzed by flow cytometry. A minimum of 20,000 lymphocytes were identified by size (FSC) and granularity (SSC) and acquired with a FACS Canto II flow cytometer (BD Biosciences). The instrument has been checked for sensitivity and overall acquisition. Data were analyzed using the Flowjo 7.2.5 software (Tree Star Inc., Ashland, Or, USA).

Quantification of cytokines

To determine cytokine production, PBMCs were cultured (1.5×10^5 cells) in RPMI medium with 10% FCS (Sigma-Aldrich) and 1% phytohemagglutinin (PHA, from Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), for 72h at 37°C and in a 5% CO₂ atmosphere. The supernatants were

collected and stored at -80°C for later analysis. The reduction variation, samples were thawed in the same day and processed together. Multiple soluble cytokines (IL-2, IL-10, IL-4, IL-5, IFN- γ , TNF- α and IL-17) were simultaneously measured by flow cytometry using the Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2/Th17 Kit (BD Biosciences). Acquisition was performed with a FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences). The instrument has been checked for sensitivity and overall performance with Cytometer Setup & Tracking beads (BD Biosciences) prior to data acquisition. Quantitative results were generated using FCAP Array v1.0.1 software (Soft Flow Inc., Pecs, Hungary).

Analysis of intracellular activated MAPKs in lymphocytes

Activated MAPKs in lymphocytes were assessed by flow cytometric evaluation of intracellular phospho-p38 and phospho-ERK expression in CD3+CD4+ and CD3+CD8+ cells. Isolated PBMCs were cultured in RPMI medium with 10% FCS and stimulated with 40nM phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) and 1 μ M ionomycin (IONO, all from Sigma-Aldrich) for 15 min at 37°C and in a 5% CO₂ atmosphere. Cells were harvested and immediately fixed and stored frozen (-80 °C) in Cytotfix solution (BD Biosciences) for later analysis. All samples were thawed in the same day and processed together to reduce variation. Cells were permeabilised on ice for 30 min with Phosflow Perm Buffer III (BD Biosciences). Cells were washed (600g, 6 min), stained for 60 min at room temperature, washed (600g, 6 min) and resuspended in final concentration of 4.5 x 10⁵ cells / 200 μ L), all in Pharmingen staining buffer (BD Biosciences). The 4-color immunofluorescent staining procedure was performed combining the following monoclonal antibodies: anti-CD3 PerCP, anti-CD4 FITC and anti-CD8 PE with anti-ERK1/2 Alexa Fluor 647 (pT202/pY204) or anti-p38 Alexa Fluor 647 (pT180/pY182, all from BD Biosciences). Lyophilized human control cells (BD Biosciences) were used as positive and negative controls due to the known presence of mitogen-activated (upregulation of phosphorylated MAPKs) or non-activated (basal levels of phospho-MAPKs) T cells in each control, respectively. A minimum of 20,000 lymphocytes were identified by size (FSC) and granularity (SSC) and acquired with a FACS Canto II flow cytometer (BD Biosciences). The instrument has been checked for sensitivity and overall performance with Cytometer Setup & Tracking beads (BD Biosciences) prior to data acquisition. Data were analyzed using the Flowjo 7.2.5 software (Tree Star Inc., Ashland, Or, USA).

Statistical analysis

All variables were tested for homogeneity of variances and normality of distribution by means of the Levene and Kolmogorov-Smirnov tests, respectively. Continuous variables differences between groups were analyzed by Student t-test or Mann-Whitney U test when appropriate. Statistical interactions between categorical variables and group were compared by means of the chi-square (χ^2) test. Statistical analyses were performed using the Statistical Package for Social Sciences, SPSS Statistics 17.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). The significance level was set at $\alpha = 0.05$ (two-tailed).

Results

Characteristics of the studied populations

Demographic and clinical characteristics of the samples are summarized in Table 1. Both groups were homogenous regarding age, gender, ethnicity, BMI and smoking habits.

Lymphocyte subsets

We screened a large panel of circulating lymphocyte subpopulations by multicolor flow cytometry, including activated, regulatory and immunosenescence markers (Table 2). The studied groups were homogenous regarding most lymphocyte markers. However, BD patients had altered proportions of regulatory T cells (Figure 1). In particular, lower percentages of natural Treg cells (CD4+CD25+FoxP3+) were significantly decreased in BD patients, as shown in Figures 1C and D ($p < 0.01$). In contrast, BD patients had higher frequencies of CD8+CD28- T cells as compared to controls ($p < 0.0001$). With respect to possible effects of pharmacotherapy, no significant associations were found with the immunological measures (all $p = \text{N.S.}$).

Cytokine production

Multiple Th1/Th2/Th17 cytokines (IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-17, IFN- γ and TNF- α) were assessed in culture supernatants by CBAs. Table 3 shows the cytokine profiles following

polyclonal T-cell stimulation. All cytokines were found significantly increased in BD when compared with healthy controls (all $p < 0.01$). To further investigate the cytokine profiles we compared the cytokine ratios between the two groups. BD patients showed higher IL-6/IL-4, TNF- α /IL-4, IFN- γ /IL-4 and IFN- γ /IL-10 ratios compared to controls (Figure 2), suggesting a strong bias to Th1 rather than Th2 profile. There were no statistical differences regarding the remaining cytokine ratios (all $p = \text{N.S.}$).

Analysis of intracellular phospho-MAPKs in peripheral lymphocytes

We have also analyzed the expression of phosphorylated p-38 and p-ERK MAPKs in lymphocytes following stimulation with PMA and IONO. Figure 3 shows the unstimulated (solid line) and activated (dotted line) profiles of a representative sample. The expression of p-ERK MAPK in T CD8⁺ and CD4⁺ cells, as estimated by the mean fluorescence intensity (MFI) was found increased in patients in comparison with controls (Figure 4D). This was not observed for the p-p38 expression (Figure 4E). Since p38 and ERK have opposite cellular effects, we also analyzed the p-ERK/p-p38 ratios in T cells (Figures 4C,F). As shown in Figure 4F, the p-ERK/p-p38 ratio was found increased in patients compared to controls. There were no significant differences in the percentages of T cells expressing p-ERK or p-p38 (Figures 5A,B and C).

Discussion

To our knowledge, this is the first study addressing multiple cellular and molecular mechanisms that may influence the inflammatory state observed in BD. Briefly, patients had lower proportions of natural regulatory T cells (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺) in parallel to higher cytokine production than healthy controls (with strong bias to Th1). We also observed an increased p-ERK signaling in relation to p-p38 in peripheral T-cell subsets of BD patients, indicating lymphocyte activation.

Data presented here are in accordance to previous studies suggesting an immune/inflammatory imbalance in BD. PBMCs of BD patients produced significantly higher amounts of IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-17, IFN- γ and TNF- α than controls *in vitro*. This method has advantages to serum/plasma sampling because it minimizes the effects of medications in serum, as cells are repeatedly washed prior to culture, and it can precisely measure the cell

source of cytokines. In order to have a better understanding of what could represent these high rates of cytokines, we analyzed the pro-inflammatory/anti-inflammatory cytokine ratios. BD was associated with a strong bias to Th1 (pro-inflammatory) rather than Th2 profile. There is scarce immune data regarding euthymic BD patients (3, 17, 18). Previous studies have observed increased plasma levels of pro-inflammatory cytokines during manic (3-7) or depressive episodes (6-8), suggesting this immune/inflammatory imbalance could be a trait phenomenon in BD and may contribute to its pathophysiology. Indeed, we have recently shown that plasma TNF- α and sTNFR2 levels were negatively correlated to cognitive (executive) functions in BD type I euthymic patients (19).

Specific changes in circulating lymphocytes may contribute to the immune/inflammatory imbalance observed in BD. This study investigated for the first time in BD a large panel of lymphocyte subpopulations, including activated and regulatory cells as well as immunosenescence markers. BD patients had significantly lower proportions of natural Tregs than controls (-55.91%), potentially implicated with the pro-inflammatory status. Indeed, the lack of regulatory T cells has been observed in several chronic inflammatory conditions (11). The study of the Tregs cells in mood disorders is extremely scarce. Our study is in accordance with recent studies reporting low proportions of Tregs in major depression (20, 21). However, a recent study did not observe changes in Tregs in BD patients as compared to controls (10). Future studies are necessary to address the functional activity of these cells and to give further support to the data presented here.

BD patients had also significantly higher frequencies (42.9%) of CD8+CD28- regulatory T cells, which are commonly associated with immunosenescence (22-25). The co-stimulatory molecule CD28 is necessary to initiate T-cell mediated immune responses. Aging has been associated with progressive loss of CD28 marker and increased CD8+CD28- T cell populations (22-25). The CD8+CD28- T cells have regulatory functions and are defined as highly expanded, terminally differentiated, or senescent memory T lymphocytes. These cells have undergone many rounds of cell divisions presumably as a result of lifetime exposure to common persistent antigens. Indeed, CD8+CD28- cells accumulate during persistent viral infections (e.g. HIV, CMV, EBV and HTLV) (26-30) and autoimmune diseases (e.g. lupus, rheumatoid arthritis and Crohn's disease) (31-33). It has been shown a dramatic loss of telomerase activity in CD8+CD28- cells that limits their proliferative capacity (23). Recently, Elvsashagen and colleagues (2011) found a reduction in telomere length in BD type 2 pa-

tients, representing 13 years of accelerated aging and correlated with lifetime number of depressive episodes (34). Taken together these data point to a possible role of early aging of immune system in the pathophysiology of mood disorders, notably BD. These results also concur to the hypothesis of increased allostatic load in BD (35), suggesting that cumulative stress- or episode-induced changes in brain regions involved with the emotional circuitry would render BD patients more vulnerable to subsequent environmental stressors.

The immune/inflammatory imbalance observed in BD could be also explained by the differential expression of intracellular signaling cascades. From many intracellular signaling cascades potentially involved with a pro-inflammatory status, we have studied the MAPKs that are crucially involved with lymphocyte activation and proliferation (13). Of note, we evaluated MAPKs ERK and p38 that are implicated with lymphocyte activation/proliferation (36) and cellular energy (37), respectively. We specifically targeted the expression of phosphorylated (activated) ERK and p38 in major T-cell subsets, CD3+CD4+ and CD3+CD8+ cells. We report for the first time an increased p-ERK signaling in relation to p-p38 in BD as compared to controls, potentially underlying activation of T lymphocytes and contributing to immune/inflammatory imbalance observed in BD. Research is under progress in our laboratories to explore different intracellular signaling cascades involved with cell activation in type I euthymic BD patients.

There are some limitations in this study to be discussed. One of the major limitations of our study is that all BD patients were receiving psychotropic drugs (i.e. lithium) that may modulate immune functions. It should be noted, however, that previous studies indicate that lithium exhibits potent anti-inflammatory effects (38, 39). These findings do not mitigate our data since all cytokines assessed in supernatants were found significantly increased in BD as compared to healthy controls. Other limitation is the criteria for euthymic state. We adopt a recognized criterion with one point assessment, but some authors have been suggested to consider at least 4 months without symptoms as a better criterion (40). The point is that our patients have around 10 years of illness duration, turning very difficult to find those type 1 BD euthymic patients. This contributed to our relatively small sample, despite the stringed exclusion criteria.

In conclusion, our data suggest that BD patients exhibit an immune/inflammatory imbalance, associated with reduced proportions of circulating Tregs and expansion of terminally differentiated or senescent T cells (CD8+CD28-). These data concur to an early

immunosenescence process in these patients. MAPKs and other intracellular signaling cascades should be further explored to assess their role to the pathophysiology of BD.

Acknowledgments

We are very grateful to the patients and staff at the Hospital Presidente Vargas. We would like also to thank Ledo Daruy Filho, MD for helping with psychiatric assessments. This work was supported by grants from CNPq (MEB, LBR, ALT and RG-O) and CAPES (CHP, AW).

Financial disclosures

The authors have no conflict of interests to declare.

References

1. Brietzke E, Stabellini R, Grassi-Oliveira R, Lafer B (2011): Cytokines in Bipolar Disorder: Recent Findings, Deleterious Effects But Promise for Future Therapeutics. *CNS Spectr.*
2. Miller AH, Maletic V, Raison CL (2009): Inflammation and its discontents: the role of cytokines in the pathophysiology of major depression. *Biol Psychiatry.* 65:732-741.
3. Brietzke E, Stertz L, Fernandes BS, Kauer-Sant'anna M, Mascarenhas M, Escosteguy Vargas A, et al. (2009): Comparison of cytokine levels in depressed, manic and euthymic patients with bipolar disorder. *J Affect Disord.* 116:214-217.
4. Barbosa IG, Huguet RB, Mendonca VA, Sousa LP, Neves FS, Bauer ME, et al. (2011): Increased plasma levels of soluble TNF receptor I in patients with bipolar disorder. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 261:139-143.
5. Kim HW, Rapoport SI, Rao JS (2010): Altered expression of apoptotic factors and synaptic markers in postmortem brain from bipolar disorder patients. *Neurobiol Dis.* 37:596-603.
6. Kim YK, Myint AM, Lee BH, Han CS, Lee SW, Leonard BE, et al. (2004): T-helper types 1, 2, and 3 cytokine interactions in symptomatic manic patients. *Psychiatry Res.* 129:267-272.
7. O'Brien SM, Scully P, Scott LV, Dinan TG (2006): Cytokine profiles in bipolar affective disorder: focus on acutely ill patients. *J Affect Disord.* 90:263-267.
8. Ortiz-Dominguez A, Hernandez ME, Berlanga C, Gutierrez-Mora D, Moreno J, Heinze G, et al. (2007): Immune variations in bipolar disorder: phasic differences. *Bipolar Disord.* 9:596-602.
9. Breunis MN, Kupka RW, Nolen WA, Suppes T, Denicoff KD, Leverich GS, et al. (2003): High numbers of circulating activated T cells and raised levels of serum IL-2 receptor in bipolar disorder. *Biol Psychiatry.* 53:157-165.
10. Drexhage RC, Hoogenboezem TH, Versnel MA, Berghout A, Nolen WA, Drexhage HA (2011): The activation of monocyte and T cell networks in patients with bipolar disorder. *Brain Behav Immun.* 25:1206-1213.
11. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M (2008): Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell.* 133:775-787.
12. Sosa MS, Avivar-Valderas A, Bragado P, Wen HC, Aguirre-Ghiso JA (2011): ERK1/2 and p38alpha/beta signaling in tumor cell quiescence: opportunities to control dormant residual disease. *Clin Cancer Res.* 17:5850-5857.
13. Strniskova M, Barancik M, Ravingerova T (2002): Mitogen-activated protein kinases and their role in regulation of cellular processes. *Gen Physiol Biophys.* 21:231-255.
14. Furler RL, Uittenbogaart CH (2010): Signaling through the P38 and ERK pathways: a common link between HIV replication and the immune response. *Immunol Res.* 48:99-109.
15. Raman M, Chen W, Cobb MH (2007): Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene.* 26:3100-3112.
16. Clark L, Iversen SD, Goodwin GM (2002): Sustained attention deficit in bipolar disorder. *Br J Psychiatry.* 180:313-319.

17. Guloksuz S, Aktas Cetin E, Cetin T, Deniz G, Oral ET, Nutt DJ (2010): Cytokine levels in euthymic bipolar patients. *J Affect Disord*.
18. Kunz M, Cereser KM, Goi PD, Fries GR, Teixeira AL, Fernandes BS, et al. (2011): Serum levels of IL-6, IL-10 and TNF-alpha in patients with bipolar disorder and schizophrenia: differences in pro- and anti-inflammatory balance. *Rev Bras Psiquiatr*. 33:268-274.
19. Barbosa IG, Rocha NP, Huguete RB, Ferreira RA, Salgado JV, Carvalho LA, et al. (2012): Executive dysfunction in euthymic bipolar disorder patients and its association with plasma biomarkers. *J Affect Disord*.
20. Li Y, Xiao B, Qiu W, Yang L, Hu B, Tian X, et al. (2010): Altered expression of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells and its 5-HT(1a) receptor in patients with major depression disorder. *J Affect Disord*. 124:68-75.
21. Chen Y, Jiang T, Chen P, Ouyang J, Xu G, Zeng Z, et al. (2011): Emerging tendency towards autoimmune process in major depressive patients: a novel insight from Th17 cells. *Psychiatry Res*. 188:224-230.
22. Pawelec G, Derhovanessian E, Larbi A, Strindhall J, Wikby A (2009): Cytomegalovirus and human immunosenescence. *Rev Med Virol*. 19:47-56.
23. Strioga M, Pasukoniene V, Characiejus D (2011): CD8+ CD28- and CD8+ CD57+ T cells and their role in health and disease. *Immunology*. 134:17-32.
24. Weng NP, Akbar AN, Goronzy J (2009): CD28(-) T cells: their role in the age-associated decline of immune function. *Trends Immunol*. 30:306-312.
25. Faria AM, de Moraes SM, de Freitas LH, Speziali E, Soares TF, Figueiredo-Neves SP, et al. (2008): Variation rhythms of lymphocyte subsets during healthy aging. *Neuroimmunomodulation*. 15:365-379.
26. Appay V, Rowland-Jones SL (2002): Premature ageing of the immune system: the cause of AIDS? *Trends Immunol*. 23:580-585.
27. Pillat MM, Correa BL, da Rocha CF, Muller GC, Lopes RP, Lampert SS, et al. (2009): Changes in T cell phenotype and activated MAPKs are correlated to impaired cellular responses to antigens and glucocorticoids during HTLV-I infection. *J Neuroimmunol*. 216:76-84.
28. Fiorentino S, Dalod M, Olive D, Guillet JG, Gomard E (1996): Predominant involvement of CD8+CD28- lymphocytes in human immunodeficiency virus-specific cytotoxic activity. *J Virol*. 70:2022-2026.
29. Ouyang Q, Wagner WM, Wikby A, Walter S, Aubert G, Dodi AI, et al. (2003): Large numbers of dysfunctional CD8+ T lymphocytes bearing receptors for a single dominant CMV epitope in the very old. *J Clin Immunol*. 23:247-257.
30. Effros RB, Allsopp R, Chiu CP, Hausner MA, Hirji K, Wang L, et al. (1996): Shortened telomeres in the expanded CD28-CD8+ cell subset in HIV disease implicate replicative senescence in HIV pathogenesis. *AIDS*. 10:F17-22.
31. Neil GA, Summers RW, Cheyne BA, Carpenter C, Huang WL, Waldschmidt TJ (1994): Analysis of T-lymphocyte subpopulations in inflammatory bowel diseases by three-color flow cytometry. *Dig Dis Sci*. 39:1900-1908.

32. Imberti L, Sottini A, Signorini S, Gorla R, Primi D (1997): Oligoclonal CD4+ CD57+ T-cell expansions contribute to the imbalanced T-cell receptor repertoire of rheumatoid arthritis patients. *Blood*. 89:2822-2832.
33. Kaneko H, Saito K, Hashimoto H, Yagita H, Okumura K, Azuma M (1996): Preferential elimination of CD28+ T cells in systemic lupus erythematosus (SLE) and the relation with activation-induced apoptosis. *Clin Exp Immunol*. 106:218-229.
34. Elvsashagen T, Vera E, Boen E, Bratlie J, Andreassen OA, Josefsen D, et al. (2011): The load of short telomeres is increased and associated with lifetime number of depressive episodes in bipolar II disorder. *J Affect Disord*. 135:43-50.
35. Kapczinski F, Vieta E, Andreazza AC, Frey BN, Gomes FA, Tramontina J, et al. (2008): Allostatic load in bipolar disorder: implications for pathophysiology and treatment. *Neurosci Biobehav Rev*. 32:675-692.
36. Li YQ, Hii CS, Der CJ, Ferrante A (1999): Direct evidence that ERK regulates the production/secretion of interleukin-2 in PHA/PMA-stimulated T lymphocytes. *Immunology*. 96:524-528.
37. Ohkusu-Tsukada K, Tominaga N, Udono H, Yui K (2004): Regulation of the maintenance of peripheral T-cell anergy by TAB1-mediated p38 alpha activation. *Mol Cell Biol*. 24:6957-6966.
38. Goldstein BI, Kemp DE, Soczynska JK, McIntyre RS (2009): Inflammation and the phenomenology, pathophysiology, comorbidity, and treatment of bipolar disorder: a systematic review of the literature. *J Clin Psychiatry*. 70:1078-1090.
39. Knijff EM, Breunis MN, Kupka RW, de Wit HJ, Ruwhof C, Akkerhuis GW, et al. (2007): An imbalance in the production of IL-1beta and IL-6 by monocytes of bipolar patients: restoration by lithium treatment. *Bipolar Disord*. 9:743-753.
40. Olley A, Malhi GS, Mitchell PB, Batchelor J, Lagopoulos J, Austin MP (2005): When euthymia is just not good enough: the neuropsychology of bipolar disorder. *J Nerv Ment Dis*. 193:323-330.

LEGENDS FOR TABLES AND FIGURES

Table 1. Characteristics of the studied populations.

Table 2. Immunophenotyping of lymphocyte subsets.

Table 3. Th1 and Th2 cytokines in bipolar disorder (n=27) compared with healthy controls (n=24).

Figure 1. Major regulatory T cells in BD and healthy controls. Figures show the percentages (A, C) and representative dot plots (B, D) of regulatory T CD8⁺ and CD4⁺ cells of gated peripheral lymphocytes. Statistical significant differences are indicated: ** p<0.0001 and * p<0.01.

Figure 2. Th1/Th2 cytokine ratios between BD patients and healthy controls. Statistical significant differences are indicated: * p<0.01, **p<0.0001.

Figure 3. Gating strategy (A) and representative graphs (B) of intracellular MAPK expression by flow cytometry. Cells were stimulated (dotted line) with 40 nM PMA and 1 μ M ionomycin (IONO) for 15 min to assess phosphorylated MAPK in major T-cell subsets.

Figure 4. Analysis of intracellular activated MAPKs in peripheral T-cell subsets. Data show the expression of MAPK profiles of lymphocytes following stimulation with 40 nM PMA and 1 μ M ionomycin (IONO) for 15 min. (A-B) Percentages of phospho-p38⁺ and phospho-ERK⁺ T cells. (C, F) p-ERK/p-38 ratio in T cells. (D-E) Mean fluorescence intensity (MFI) of p-p38 and p-ERK expression in T-cell subsets. Statistical significant differences are indicated: * p<0.01, **p<0.0001.

Table 1.

	BD (M±DP)	Controls	P-value
N	27	24	-
Age (M ± SD)	45.72 ± 9.22	40.48 ± 13.24	NS
BMI (M ± SD)	29.21 ± 5.55	23.5 ± 2.18	NS
Years of illness (mean and interval)	10.44 (1-46)	-	-
HDRS (M ± SD)	4.96 ± 2.21	-	-
YMRS (M ± SD)	1.70 ± 2.09	-	-
Ethnicity (white/non-white)	21/6	23/1	NS
Smoking	5	2	NS
Lithium	18	-	-
Antidepressants	11	-	-
Antipsychotics	11	-	-
Anticonvulsants	3	-	-

Data shown as mean (M) ± standard deviation (SD). Abbreviations: BMI, body mass index; Bipolar disorder (BD); Hamilton Depression Rating Scale (HDRS); the Young Mania Rating Scale (YMRS); NS, not significant.

Table 2.

Markers	Cell Type	BD (%)	Control (%)	P-value
CD3+CD4+	Th	48.51 ± 6.83	48.19 ± 6.98	NS
CD3+CD8+	Tc	24.96 ± 6.92	25.09 ± 6.11	NS
CD3-CD19+	B	8.59 ± 4.61	7.40 ± 2.30	NS
CD3-CD56+	NK	11.18 ± 11.47	13.02 ± 8.51	NS
CD3+CD56+	NK T	6.55 ± 6.08	8.46 ± 20.13	NS
CD4+CD45RO+	Memory (Th)	27.86 ± 9.73	27.40 ± 5.10	NS
CD8+CD45RO+	Memory (Tc)	10.52 ± 6.60	9.99 ± 3.01	NS
CD4+CD25+	Activated T cell	1.34 ± 0.72	1.97 ± 1.66	NS
CD3+CD69+	Activated T cell	2.32 ± 1.33	2.27 ± 1.23	NS
CD8+CD28+	Activated T cell	14.24 ± 7.96	15.68 ± 5.08	NS
CD8+CD28-	Regulatory T Cell	17.92 ± 6.76	12.55 ± 5.08	0.002**
CD4+CD25+FOXP3+	Regulatory T Cell	2.33 ± 2.46	7.18 ± 10.14	0.014*
CD8+CD103+	Regulatory T Cell	0.695 ± 0.31	1.05 ± 0.68	NS
CD4+CCR7+CD45RA-	Central Memory (Th)	44.51 ± 11.22	45.40 ± 9.97	NS
CD4+CCR7-CD45RA-	Effector Memory (Th)	16.42 ± 5.68	14.42 ± 5.21	NS
CD4+CCR7+CD45RA+	Naïve T cell (Th)	34.47 ± 13.75	34.86 ± 11.56	NS
CD8+CCR7+CD45RA-	Central Memory (Tc)	24.81 ± 9.74	23.11 ± 6.95	NS
CD8+CCR7+CD45RA+	Naïve T cell (Tc)	40.85 ± 12.15	44.68 ± 9.65	NS
CD8+CCR7-CD45RA+	EMRA (Tc)	18.39 ± 6.67	16.33 ± 6.01	NS
CD8+CCR7-CD45RA-	Effector Memory (Tc)	15.88 ± 6.24	15.19 ± 5.26	NS

Abbreviations: CM = central memory. EM = effector memory. Th = T helper cell; Tc = T cytotoxic cell. Statistical significant differences are indicated: * p < 0.05, **p < 0.01.

Table 3.

	BD (pg/ml)	Controls(pg/ml)	P-value
IL-2	978.86 ± 1862.96	92.70 ± 230.38	0.005**
IL-4	60.04 ± 123.43	36.65 ± 81.32	0.015*
IL-6	9548.51 ± 3442.92	3325.25 ± 5214.56	0.001**
IL-10	3359.06 ± 2524.33	1293.92 ± 2116.79	0.002 **
TNF- α	2678.99 ± 2913.88	566.51 ± 1076.69	0.001**
IFN- γ	26572.70 ± 16014.60	9168.61 ± 17420.08	0.001**
IL-17	275.90 ± 251.24	167.08 ± 217.54	0.028*

PBMCs were isolated and stimulated with phytohemagglutinin for 72h. Supernatants were collected and cytokines measured by CBA (Cytometric Bead Array, BD). Data are shown as mean (pg/ml) \pm S.D. Statistical significant differences are indicated: *p<0.05; **p<0.01.

Figure 1.

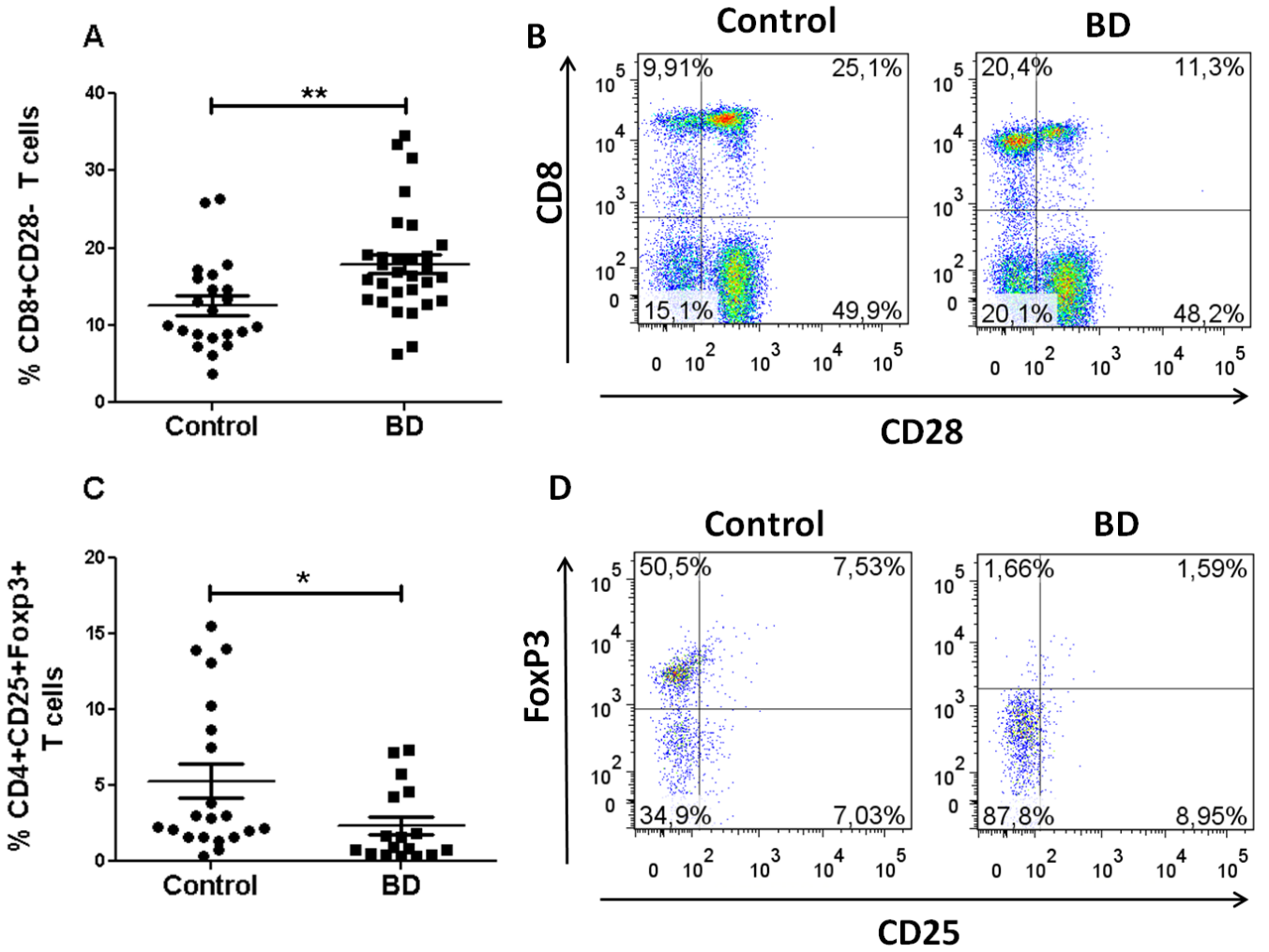


Figure 2.

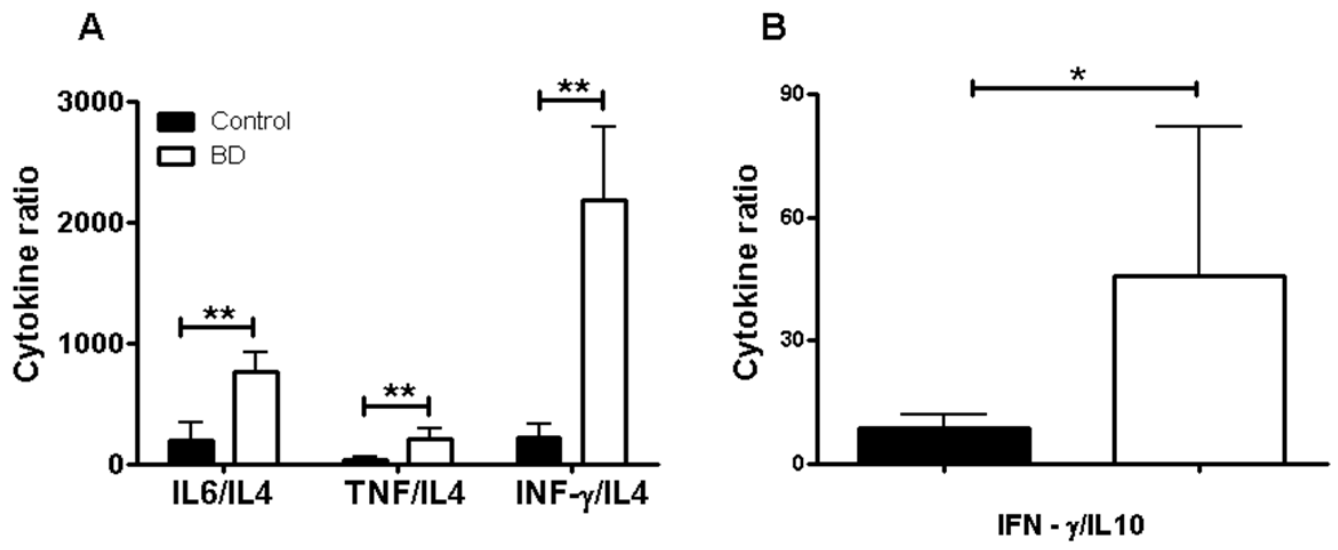


Figure 3.

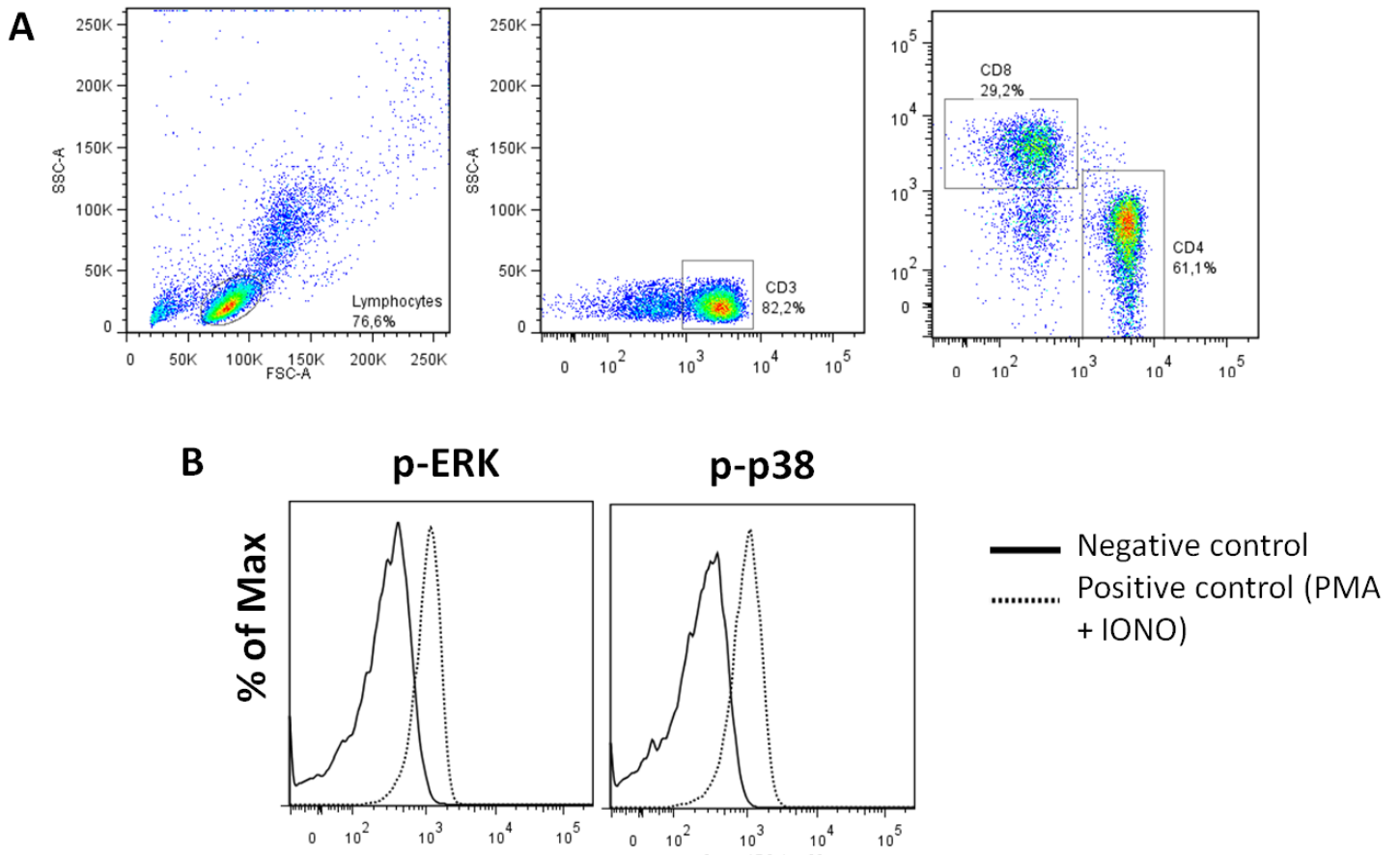
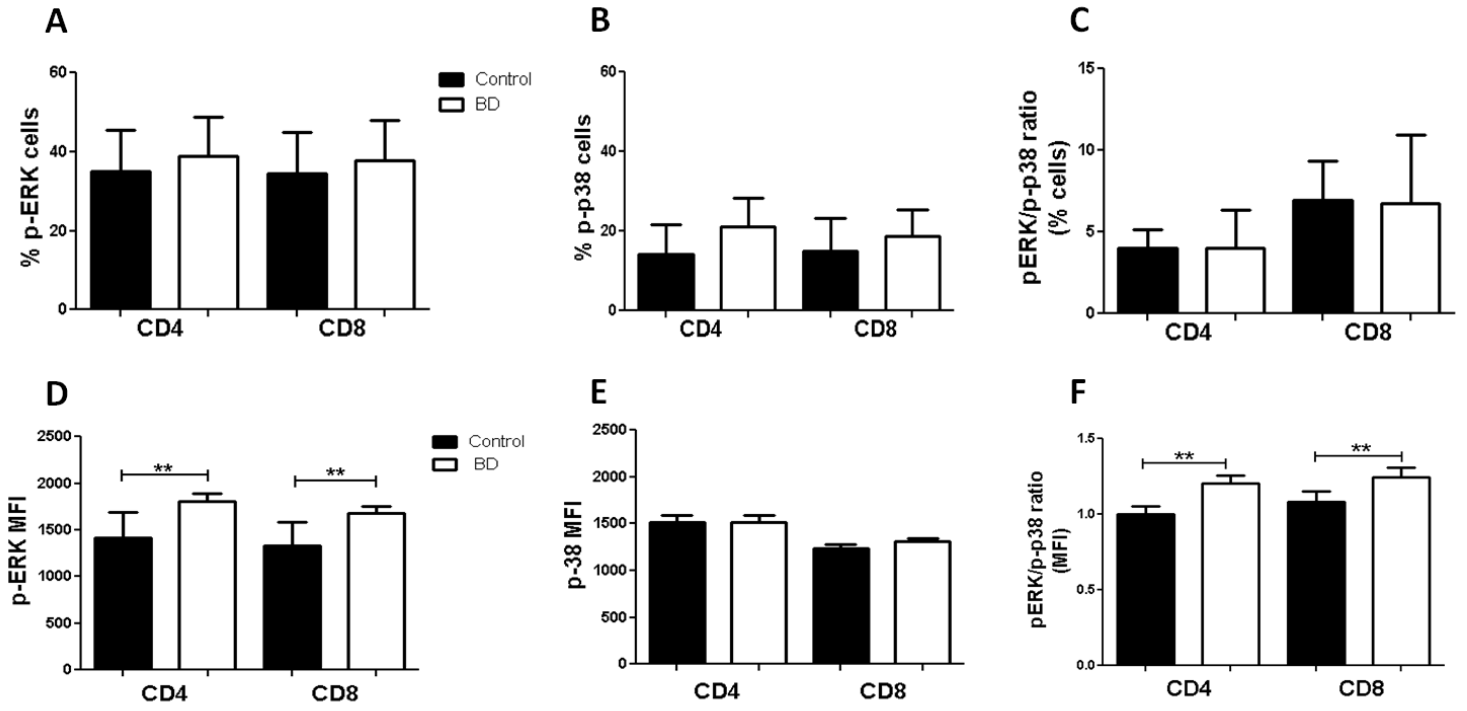


Figure 4.



3. CAPÍTULO 3

3.1. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesse estudo, analisamos vias celulares e moleculares que poderiam explicar o desequilíbrio imunológico observado no TB. Atualmente, o interesse em investigar o papel dos sistemas imune e inflamatório na patofisiologia do TB aumentou consideravelmente, devido às ações das citocinas no sistema nervoso central.

Inicialmente, verificamos a produção de citocinas no sobrenadante de linfócitos estimulados *in vitro*. Essa técnica tem vantagens em relação às medidas no plasma/soro, que não permitem a identificação das fontes produtoras das citocinas. Observamos níveis muito elevados de citocinas pró-inflamatórias (Th1/Th17) e antiinflamatórias (Th2) em indivíduos bipolares em comparação com controles saudáveis. Além disso, para examinar de que forma as citocinas estão contribuindo para a desregulação imune observada no TB, decidimos investigar a razão Th1/Th2. Nossos resultados indicaram um aumento da razão Th1/Th2 em indivíduos com TB, sugerindo que este transtorno está associado com respostas inflamatórias, mais precisamente com aumento de citocinas do tipo Th1.

As proporções celulares periféricas podem contribuir para o processo inflamatório observado no TB. O presente estudo foi o primeiro a investigar no TB uma ampla variedade de subtipos linfocitários, associados principalmente com ativação, regulação e imunossenescência. Deve ser salientado que existem poucos estudos que analisaram as populações celulares no TB. Estes subtipos celulares foram aqui avaliados com o intuito de averiguar a contribuição destas células no desequilíbrio imune observado no TB. Interessantemente, verificamos que os pacientes bipolares apresentaram uma diminuição de células T regulatórias naturais (CD4+CD25+FoxP3+) quando comparados com controles saudáveis, e um aumento na porcentagem de células T regulatórias-senescentes (CD8+CD28-). Nossos resultados estão de acordo com estudos anteriores que observaram diminuição de células T regulatórias na depressão (Li, Xiao *et al.*, 2010; Chen, Jiang *et al.*, 2011). Portanto, um número reduzido de células Tregs poderia contribuir para o desequilíbrio imunológico observado no TB. Além disso, a expansão de células T regulatórias-senescentes (CD8+CD28-) poderia estar envolvida no processo de imunossenescência precoce no TB.

Avaliamos vias intracelulares envolvidas com o processo de ativação linfocitária. Especificamente, verificamos se as MAPK estão envolvidas neste desequilíbrio imunológico do TB. Isso foi possível através do uso de uma técnica inovadora de *phosflow* (BD Biosciences)

que permite a identificação e quantificação de células que expressam proteínas fosforiladas intracelulares. As vias de sinalização p-ERK e p-38 são responsáveis por atividades de proliferação/diferenciação e inflamação/anergia, respectivamente. Verificamos um aumento significativo nos níveis de p-ERK em relação à p-38 em indivíduos com TB, quando comparados com controles saudáveis. Além disso, a razão p-ERK/p-38 está elevada em bipolares em comparação com controles saudáveis. O aumento de p-ERK no TB indica ativação linfocitária, confirmando novamente que esse transtorno está relacionado com processos de ativação imune/inflamatória.

Este estudo apresenta algumas limitações. Primeiramente, todos os sujeitos do estudo apresentavam-se medicados, a fim de manter seu humor estável (fase eutímica). O tratamento dos pacientes foi realizado em grande parte com o lítio, uma droga sabidamente capaz interagir com o sistema imune. Embora o lítio tenha uma ação anti-inflamatória, este aparentemente não influenciou o perfil pró-inflamatório encontrado nos pacientes. A segunda limitação do estudo refere-se à dificuldade de incluir no estudo apenas pacientes bipolares eutímicos, restringindo o tamanho amostral deste estudo. Como perspectivas futuras, podemos aprofundar as pesquisas em relação às MAPKs e outras vias de sinalização intracelular, e explorar outros marcadores de envelhecimento, como o comprimento da região telomérica.

Concluindo, levando em consideração o exposto, os achados deste trabalho corroboram estudos anteriores sugerindo um desequilíbrio imune no TB. Além disso, nosso estudo fornece pela primeira vez informações relevante sobre as células T regulatórias e vias de sinalização MAPKs no TB, que podem futuramente servir de alvos terapêuticos para este transtorno. O uso de anti-inflamatórios deveria ser melhor investigado na terapêutica deste importante transtorno do humor.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEER *et al.* Immunological changes in patients with mania: changes in cell mediated immunity in a sample from Egyptian patients. *Egypt J Immunol* [S.I.], v. 13, n. 1, p. 79-85, 2006.
- BALDASSANO, C. F. *et al.* Bipolar depression: an evidence-based approach. *Curr Psychiatry Rep* [S.I.], v. 13, n. 6, p. 483-7, Dec 2011.
- BAUER, M.; PFENNIG, A. Epidemiology of bipolar disorders. *Epilepsia* [S.I.], v. 46 Suppl 4, p. 8-13, 2005.
- BAUER, M. E. Chronic stress and immunosenescence: a review. *Neuroimmunomodulation* [S.I.], v. 15, n. 4-6, p. 241-50, 2008.
- BENAZZI, F. Bipolar II disorder : epidemiology, diagnosis and management. *CNS Drugs* [S.I.], v. 21, n. 9, p. 727-40, 2007.
- BREUNIS, M. N. *et al.* High numbers of circulating activated T cells and raised levels of serum IL-2 receptor in bipolar disorder. *Biol Psychiatry* [S.I.], v. 53, n. 2, p. 157-65, Jan 15 2003.
- BRIETZKE, E.; KAPCZINSKI, F. TNF-alpha as a molecular target in bipolar disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* [S.I.], v. 32, n. 6, p. 1355-61, Aug 1 2008.
- BRIETZKE, E. *et al.* Comparison of cytokine levels in depressed, manic and euthymic patients with bipolar disorder. *J Affect Disord* [S.I.], v. 116, n. 3, p. 214-7, Aug 2009.
- BROWN, E. S. *et al.* Association of depression with medical illness: does cortisol play a role? *Biol Psychiatry* [S.I.], v. 55, n. 1, p. 1-9, Jan 1 2004.
- CHEN, Y. *et al.* Emerging tendency towards autoimmune process in major depressive patients: a novel insight from Th17 cells. *Psychiatry Res* [S.I.], v. 188, n. 2, p. 224-30, Jul 30 2011.
- DABAN, C. *et al.* Hypothalamic-pituitary-adrenal axis and bipolar disorder. *Psychiatr Clin North Am* [S.I.], v. 28, n. 2, p. 469-80, Jun 2005.
- DEEKS, S. G. HIV infection, inflammation, immunosenescence, and aging. *Annu Rev Med* [S.I.], v. 62, p. 141-55, Feb 18 2011.
- DEGENHARDT, E. K. *et al.* Predictors of relapse or recurrence in bipolar I disorder. *J Affect Disord* [S.I.], Oct 28 2011.
- DREXHAGE, R. C. *et al.* The activation of monocyte and T cell networks in patients with bipolar disorder. *Brain Behav Immun* [S.I.], v. 25, n. 6, p. 1206-13, Aug 2011.

ELVSASHAGEN, T. *et al.* The load of short telomeres is increased and associated with lifetime number of depressive episodes in bipolar II disorder. *J Affect Disord* [S.I.], v. 135, n. 1-3, p. 43-50, Dec 2011.

EVANS, D. L. *et al.* Mood disorders in the medically ill: scientific review and recommendations. *Biol Psychiatry* [S.I.], v. 58, n. 3, p. 175-89, Aug 1 2005.

FAN, J.; SKLAR, P. Genetics of bipolar disorder: focus on BDNF Val66Met polymorphism. *Novartis Found Symp* [S.I.], v. 289, p. 60-72; discussion 72-3, 87-93, 2008.

FURLER, R. L.; UITTENBOGAART, C. H. Signaling through the P38 and ERK pathways: a common link between HIV replication and the immune response. *Immunol Res* [S.I.], v. 48, n. 1-3, p. 99-109, Dec 2010.

GONZALEZ-PINTO, A. *et al.* First episode in bipolar disorder: misdiagnosis and psychotic symptoms. *J Affect Disord* [S.I.], v. 50, n. 1, p. 41-4, Jul 1998.

GULOXSUZ, S. *et al.* Cytokine levels in euthymic bipolar patients. *J Affect Disord* [S.I.], May 27.

HEUSER, I. Depression, endocrinologically a syndrome of premature aging? *Maturitas* [S.I.], v. 41 Suppl 1, p. S19-23, Apr 15 2002.

HOPE, S. *et al.* Similar immune profile in bipolar disorder and schizophrenia: selective increase in soluble tumor necrosis factor receptor I and von Willebrand factor. *Bipolar Disord* [S.I.], v. 11, n. 7, p. 726-34, Nov 2009.

JAMROZINSKI, K. *et al.* Neurocognitive functions in euthymic bipolar patients. *Acta Psychiatr Scand* [S.I.], v. 119, n. 5, p. 365-74, May 2009.

KAUER-SANT'ANNA, M. *et al.* Brain-derived neurotrophic factor and inflammatory markers in patients with early- vs. late-stage bipolar disorder. *Int J Neuropsychopharmacol* [S.I.], v. 12, n. 4, p. 447-58, May 2009.

KESSLER, R. C. *et al.* Prevalence, comorbidity, and service utilization for mood disorders in the United States at the beginning of the twenty-first century. *Annual Review of Clinical Psychology* [S.I.], v. 3, p. 137-158, 2007.

KIM, E. K.; CHOI, E. J. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochim Biophys Acta* [S.I.], v. 1802, n. 4, p. 396-405, Apr 2010.

KIM, H. W. *et al.* Altered expression of apoptotic factors and synaptic markers in postmortem brain from bipolar disorder patients. *Neurobiol Dis* [S.I.], v. 37, n. 3, p. 596-603, Mar 2010.

KIM, Y. K. *et al.* T-helper types 1, 2, and 3 cytokine interactions in symptomatic manic patients. *Psychiatry Res* [S.I.], v. 129, n. 3, p. 267-72, Dec 30 2004.

- KNIJFF, E. M. *et al.* A relative resistance of T cells to dexamethasone in bipolar disorder. *Bipolar Disord* [S.I.], v. 8, n. 6, p. 740-50, Dec 2006.
- KRISHNA, M.; NARANG, H. The complexity of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) made simple. *Cell Mol Life Sci* [S.I.], v. 65, n. 22, p. 3525-44, Nov 2008.
- KUPFERSCHMIDT, D. A.; ZAKZANIS, K. K. Toward a functional neuroanatomical signature of bipolar disorder: quantitative evidence from the neuroimaging literature. *Psychiatry Res* [S.I.], v. 193, n. 2, p. 71-9, Aug 30 2011.
- KUPKA, R. W. *et al.* Immune activation, steroid resistancy and bipolar disorder. *Bipolar Disord* [S.I.], v. 4 Suppl 1, p. 73-4, 2002.
- LI, Y. *et al.* Altered expression of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells and its 5-HT(1a) receptor in patients with major depression disorder. *J Affect Disord* [S.I.], v. 124, n. 1-2, p. 68-75, Jul 2010.
- O'BRIEN, S. M. *et al.* Cytokine profiles in bipolar affective disorder: focus on acutely ill patients. *J Affect Disord* [S.I.], v. 90, n. 2-3, p. 263-7, Feb 2006.
- OFFORD, J. Genetic approaches to a better understanding of bipolar disorder. *Pharmacol Ther* [S.I.], Oct 8 2011.
- ORTIZ-DOMINGUEZ, A. *et al.* Immune variations in bipolar disorder: phasic differences. *Bipolar Disord* [S.I.], v. 9, n. 6, p. 596-602, Sep 2007.
- PADMOS, R. C. *et al.* A high prevalence of organ-specific autoimmunity in patients with bipolar disorder. *Biol Psychiatry* [S.I.], v. 56, n. 7, p. 476-82, Oct 1 2004.
- PROVENCHER, M. D. *et al.* Psychotherapies for comorbid anxiety in bipolar spectrum disorders. *J Affect Disord* [S.I.], v. 133, n. 3, p. 371-80, Oct 2011.
- RAISON, C. L. *et al.* Cytokines sing the blues: inflammation and the pathogenesis of depression. *Trends Immunol* [S.I.], v. 27, n. 1, p. 24-31, Jan 2006.
- RAMAN, M. *et al.* Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene* [S.I.], v. 26, n. 22, p. 3100-12, May 14 2007.
- RAPAPORT, M. H. Immune parameters in euthymic bipolar patients and normal volunteers. *J Affect Disord* [S.I.], v. 32, n. 3, p. 149-56, Nov 1994.
- ROUX, P. P.; BLENIS, J. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev* [S.I.], v. 68, n. 2, p. 320-44, Jun 2004.

SAKAGUCHI, S. *et al.* Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* [S.I.], v. 133, n. 5, p. 775-87, May 30 2008.

SANCHES, M.; SOARES, J. C. New drugs for bipolar disorder. *Curr Psychiatry Rep* [S.I.], v. 13, n. 6, p. 513-21, Dec 2011.

SERRETTI, A. *et al.* Dopamine receptor D2 Ser/Cys 311 variant is associated with delusion and disorganization symptomatology in major psychoses. *Mol Psychiatry* [S.I.], v. 5, n. 3, p. 270-4, May 2000.

SHALEV, I. *et al.* BDNF Val66Met polymorphism is associated with HPA axis reactivity to psychological stress characterized by genotype and gender interactions. *Psychoneuroendocrinology* [S.I.], v. 34, n. 3, p. 382-8, Apr 2009.

SOSA, M. S. *et al.* ERK1/2 and p38alpha/beta signaling in tumor cell quiescence: opportunities to control dormant residual disease. *Clin Cancer Res* [S.I.], v. 17, n. 18, p. 5850-7, Sep 15 2011.

VERMANI, M. *et al.* Rates of detection of mood and anxiety disorders in primary care: a descriptive, cross-sectional study. *Prim Care Companion CNS Disord* [S.I.], v. 13, n. 2, 2011.

VINBERG, M. *et al.* The BDNF Val66Met polymorphism: relation to familiar risk of affective disorder, BDNF levels and salivary cortisol. *Psychoneuroendocrinology* [S.I.], v. 34, n. 9, p. 1380-9, Oct 2009.

WATSON, S. *et al.* Hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in patients with bipolar disorder. *Br J Psychiatry* [S.I.], v. 184, p. 496-502, Jun 2004.

WOLKOWITZ, O. M. *et al.* Leukocyte telomere length in major depression: correlations with chronicity, inflammation and oxidative stress--preliminary findings. *PLoS One* [S.I.], v. 6, n. 3, p. e17837, 2011.