

Testes sanguíneos de biomarcadores para diagnóstico e tratamento de desordens mentais: foco em esquizofrenia

Biomarker blood tests for diagnosis and management of mental disorders: focus on schizophrenia

SABINE BAHN^{1,2}, EMANUEL SCHWARZ¹, LAURA W. HARRIS¹, DANIEL MARTINS-DE-SOUZA^{1,3}, HASSAN RAHMOUNE¹, PAUL C. GUEST¹

¹ Departamento de Engenharia Química e Biotecnologia, Universidade de Cambridge, Tennis Court Road, Cambridge, UK.

² Departamento de Neurociências, Centro Médico Erasmus, Holanda.

³ Instituto Max Planck de Psiquiatria e Universidade Ludwig Maximilians de Munique (LMU), Alemanha; Laboratório de Neurociências (LIM-27), Instituto de Psiquiatria, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (IPq-FMUSP), Brasil.

Recebido: 23/9/2012 – Aceito: 7/11/2012

Resumo

A descoberta e a aplicação clínica de biomarcadores para desordens mentais são confrontadas com muitos desafios. Em geral, os atuais métodos de descoberta e validação de biomarcadores não produziram os resultados que foram inicialmente aguardados depois da finalização do Projeto Genoma Humano. Isso se deve principalmente à falta de processos padronizados conectando a descoberta de marcadores com tecnologias para a validação e a tradução para uma plataforma que ofereça precisão e fácil uso em clínica. Como consequência, a maior parte dos psiquiatras e praticantes em geral são relutantes em aceitar que testes de biomarcadores pode suplementar ou substituir os métodos de diagnóstico utilizados baseados em entrevista. Apesar disso, agências regulatórias concordam agora que melhoras nos correntes métodos são essenciais. Além disso, essas agências estipularam que biomarcadores são importantes para o desenvolvimento de futuras drogas e iniciaram esforços no sentido de modernizar métodos e técnicas para suportar esses esforços. Aqui revisamos os desafios encontrados por essa tentativa do ponto de vista de psiquiatras, praticantes em geral, agências reguladoras e cientistas de biomarcadores. Também descrevemos o desenvolvimento de um novo teste sanguíneo molecular para esquizofrenia como um primeiro passo a esse objetivo.

Bahn S, et al. / *Rev Psiq Clín.* 2013;40(1):2-9

Palavras-chave: Desordens psiquiátricas, esquizofrenia, diagnóstico, biomarcadores, autoridades reguladoras.

Abstract

The discovery and clinical application of biomarkers for mental disorders is faced with many challenges. In general, the current methods for discovery and validation of biomarkers have not produced the results which were first anticipated after completion of the human genome project. This is mostly due to the lack of a standardized pipeline connecting marker discovery with technologies for validation and translation to a platform that offers accuracy and ease of use in a clinical setting. As a consequence, most psychiatrists and general practitioners are still reluctant to accept that biomarker tests can supplement or replace the long standing interview-based methods for diagnosis. Despite this, the regulatory agencies now agree that improvements over the current methods are essential. Furthermore, these agencies stipulate that biomarkers are important for future drug development and have initiated efforts to modernize methods and techniques to support these efforts. Here, we review the challenges faced by this endeavour from the point of view of psychiatrists, general practitioners, the regulatory agencies and biomarker scientists. We also describe the development of a novel molecular blood-test for schizophrenia as a first promising step towards achieving this goal.

Bahn S, et al. / *Rev Psiq Clín.* 2013;40(1):2-9

Keywords: Psychiatric disorders, schizophrenia, diagnosis, biomarkers, regulatory authorities.

Introdução

Tentativas para identificar biomarcadores moleculares para desordens psiquiátricas tais como a esquizofrenia estão ocorrendo há muitos anos. Tem sido esperado que tais biomarcadores possam ser usados como testes padronizados para facilitar o diagnóstico, bem como o tratamento e a monitoração de pacientes. Até o presente, essas desordens são diagnosticadas por clínicos e psiquiatras com base em entrevistas subjetivas dos indivíduos por meio de questionários. Entretanto, os sistemas de classificação diagnósticos usados, tais como o Manual Diagnóstico e Estatístico de Desordens Mentais IV (DSM-IV)¹ e a Classificação Internacional de Doenças 10 (ICD-10; <http://www.who.int/classifications/icd/en/>), são conhecidos por possuírem alguns defeitos. Agora se pensa que biomarcadores, que são reflexos da fisiopatologia da doença ou o mecanismo de remédios atualmente usados, levarão a melhores diagnósticos e potencialmente pavimentarão o caminho para tratamentos mais efetivos de pacientes. Isso pode requerer a desconstrução de procedimentos existentes de longa data que objetivavam a classificação de categorias abrangentes de pacientes em favor de subtipos de doença definidos por biomar-

cadore. No fim, isso assistirá as abordagens médicas personalizadas para essas devastadoras condições (Figura 1).

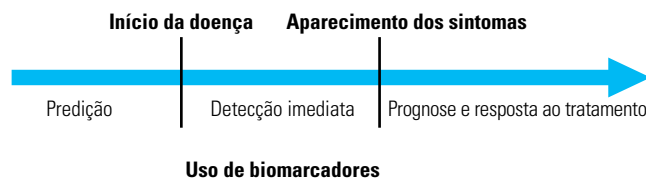


Figura 1. Estágios esperados no uso de biomarcadores para desordens psiquiátricas.

O desenvolvimento de biomarcadores e as implicações do uso deles no diagnóstico e testes clínicos estão avançando, apesar de não apresentarem um passo firme. Isso levou à necessidade do estabelecimento de procedimentos operacionais padrão para contornar as dificuldades atuais e, ao mesmo tempo, acordar com as exigências

regulatórias. Agências regulatórias de saúde como a Administração Americana de Alimentos e Drogas (FDA) consideram a incorporação de biomarcadores em projetos de descoberta de drogas como uma importante próxima fase na indústria farmacêutica. A FDA lançou esforços agora para modernizar e padronizar métodos objetivando o lançamento de drogas mais efetivas e seguras^{2,3}. Isso requer que moléculas alcancem o *status* de biomarcadores validados anteriormente à decisão regulatória de uso em testes clínicos. Para esse fim, a FDA estabeleceu um conjunto de regras dizendo que há três classes de biomarcadores: 1) biomarcadores exploratórios, 2) biomarcadores provavelmente válidos e 3) biomarcadores sabidamente válidos⁴. Para a classe de biomarcadores exploratórios, deve haver evidência científica para prova de conceito. A classe de prováveis biomarcadores requer que os biomarcadores em questão possam ser medidos em sistemas de testes analíticos com características estritas de *performance* e que haja achados científicos que expliquem a relevância e a significância dos resultados. A classe de biomarcadores sabidamente válidos requer que os resultados possam ser reproduzidos em diferentes laboratórios em diferentes lugares.

No caso de desordens psiquiátricas, é esperado que isso seja difícil de alcançar. Uma razão para isso é que essas condições são pobremente conhecidas, há uma sobreposição de sintomas por meio de diferentes desordens e há considerável heterogeneidade em como essas condições são manifestadas em diferentes indivíduos. Entretanto, plataformas moleculares emergentes têm facilitado a identificação de biomarcadores mediante a mensuração de centenas ou milhares de moléculas. Isso serviu para que fosse aumentada a precisão dos achados e minimizados a quantidade de amostra requerida e os custos do processo. Empregamos recentemente uma plataforma de perfil por imunensaio multiplexado para analisar amostras de soro de pacientes esquizofrênicos, o que levou à identificação de um painel de moléculas que poderiam classificar indivíduos esquizofrênicos comparados a controle com uma precisão maior do que 80%⁵.

Nesta revisão, serão discutidos os desafios do desenvolvimento e implementação de um teste de biomarcador molecular para desordens psiquiátricas. Daremos atenção ao problema geral da introdução do novo paradigma da utilização de biomarcadores moleculares no campo da psiquiatria, o qual tem, até esta data, dependido de abordagens não moleculares. Também se discutirão os desafios associados e métodos para a identificação de biomarcadores. Finalmente, será detalhado o potencial uso de biomarcadores moleculares no campo das desordens psiquiátricas, particularmente para uma mais apurada classificação clínica e tratamento de pacientes e como meio de facilitar a descoberta de drogas dentro da indústria farmacêutica.

Dificuldades atuais nos diagnósticos psiquiátricos

A maioria dos psiquiatras concorda que a esquizofrenia é um termo “guarda-chuva” para uma mistura de etiologias que se apresentam com sintomas similares, da mesma forma que as doenças infecciosas se apresentam com febre⁶. Sendo assim, um diagnóstico errado é um problema comum na prática psiquiátrica. Por exemplo, um estudo no fim dos anos 1990 achou que 31% dos pacientes com desordem bipolar foram inicialmente diagnosticados com esquizofrenia⁷. Outro estudo desafiou os fundamentos assumidos dos sistemas de classificação correntes⁸. Esse estudo sugeriu que não há métodos para validar os atuais conceitos diagnósticos.

Uma complicação posterior é que clínicos não costumam sequer usar esses sistemas de classificação para estabelecer um diagnóstico. Em vez disso, a maioria aplica uma abordagem por entrevista desestruturada heurística. Nesse caso, a diagnose pode estar baseada em experiências e pontos de vista pessoais, mais do que correspondendo a regras ou critérios de um sistema diagnóstico. Isso pode resultar em erros sistemáticos no julgamento baseado em conceitos errôneos, ou poderia recair em uma memória seletiva. Em questões complicadas, houve pouca ou nenhuma tentativa para resolver o problema de falsos-positivos em diagnósticos de desordens mentais⁹. Um estudo que investigou a influência da etnicidade no diagnóstico dos pacientes encontrou que clínicos tendem a superestimar o número de casos

de esquizofrenia em afro-americanos¹⁰. Essa tendência foi removida quando examinadores foram providos de transcritos étnico-cegos de entrevistas de pacientes em questão.

Interessantemente, há uma aumento aparente da prevalência em esquizofrenia usando o critério para diagnóstico ICD-10 quando comparado ao DSM-IV¹¹. Ambos esses sistemas conceitualizam que as desordens mentais são diferentes entidades de doenças com patologias comuns e podem ser definidas por conjuntos de critérios operacionais baseados em sinais e sintomas. Entretanto, é improvável que sintomas específicos estejam ligados a entidades doenças definidas. Por exemplo, pacientes com desordens traumáticas, infecciosas e metabólicas podem se apresentar com sintomas similares àqueles da esquizofrenia^{12,13}. Em adição, alguns indivíduos têm sido conhecidos por forjar sintomas de esquizofrenia e outros transtornos mentais¹⁴ por várias razões.

Um estudo de 1970 achou que mudanças tempo-dependentes em diagnósticos resultavam frequentemente em erros de julgamento de prognose e tratamento subótimo¹⁵. Estudos prospectivos de pacientes que se apresentaram inicialmente com primeiro episódio de psicose mostraram que o diagnóstico inicial de esquizofrenia era mais estável ao longo de um período de cinco anos de acompanhamento. Entretanto, diagnósticos de outras condições como desordem depressiva maior com psicose, psicose induzida por droga e psicose esquizofreniforme tiveram que ser revisados mais frequentemente ao longo do tempo¹⁶. Em particular, as categorias listadas pela ICD-10 como “desordens psicóticas transitientes e agudas” e “desordem psicótica breve” representam desafios diagnósticos mais difíceis. Em um estudo de acompanhamento de 503 casos, o diagnóstico de 60% dos pacientes foi modificado pelo menos uma vez¹⁷. Similarmente, estudos de longo prazo de desordens de humor descreveram substanciais mudanças no diagnóstico de desordem depressiva maior a desordem bipolar e esquizofrenia¹⁸. Um estudo recente que investigou pacientes psiquiátricos em quatro pontos no tempo diferentes achou que somente 50% dos pacientes mantinham seu diagnóstico inicial¹⁹. Pacientes esquizofrênicos tinham o diagnóstico mais estável, já que 78% retiveram seu diagnóstico inicial. Eles foram seguidos pelos pacientes de desordem bipolar, já que 69% retiveram seu diagnóstico inicial, enquanto, para a desordem depressiva maior, somente 42% pacientes mantiveram seu diagnóstico estável. A maior mudança de diagnóstico foi de pacientes não esquizofrênicos para esquizofrênicos. De 306 pacientes com um diagnóstico não esquizofrênico no início, 32% foram eventualmente diagnosticados com essa condição.

Importância do diagnóstico precoce

A taxa de concordância para o desenvolvimento de esquizofrenia em gêmeos idênticos apresenta uma faixa de 10%-70% em diferentes estudos²⁰⁻²². Tais estudos têm provido evidência indubitável de que há um componente genético e predisposição para a esquizofrenia. Entretanto, esses achados também sugerem que um indivíduo não necessariamente desenvolve esquizofrenia mesmo quando tal predisposição genética existe. De fato, fatores ambientais e outros não genéticos parecem representar um papel mais importante na maioria dos pacientes. Fatores que poderiam afetar a função cerebral incluem complicações na gravidez e no parto, tais como hipóxia intrauterina, infecções e má nutrição^{23,24}. Há também fatores não biológicos que poderiam precipitar o início de doenças psiquiátricas, incluindo estresses psicossociais tais como a experiência de um desastre natural, perda de um membro da família, ou a crônica experiência de um mau ambiente ou uma vida familiar disfuncional²⁵.

Isso sugere que a prevenção da doença ou minimização poderia ser possível se fatores de risco ambientais pudessem ser determinados e evitados. Nós e outros pesquisadores indicamos que as anormalidades metabólicas tais como resistência à insulina ocorrem em 20%-50% dos indivíduos com esquizofrenia de primeira ordem²⁶⁻²⁸. Em adição, diversos pesquisadores encontraram alterações em fatores inflamatórios circulantes e de resposta imune em pacientes com esquizofrenia de primeira ordem^{29,30}. Em um estudo preliminar, mostramos que vários marcadores relacionados a esses subgrupos podem ser identificados em pacientes até mesmo anteriormente ao início da doença³¹.

Esse estudo analisou soro obtido de pessoal do exército americano aproximadamente 30 dias antes do início dos sintomas.

Será importante determinar se a conversão da doença pode ou não ser prevenida ou mesmo minimizada em indivíduos em risco. Houve extensivos relatos descrevendo a importância da intervenção precoce em indivíduos com alto risco de desenvolvimento de esquizofrenia³²⁻³⁴. Um atraso no diagnóstico pode ter efeitos deletérios na vida dos pacientes, incluindo abuso de substâncias, alienação social da família e amigos, aumento de acidentes, dano pessoal e dano para outros. Em adição, erros de diagnóstico podem levar a um tratamento inefetivo ou que produza efeitos ainda mais prejudiciais. Por exemplo, diagnóstico errôneo de desordem bipolar como esquizofrenia foi relacionado com aumento de risco na tentativa de suicídio³⁵, hospitalização mais longa⁷ e sérios problemas psicológicos, legais e financeiros³⁶. Em adição, erros nos diagnósticos têm inúmeras consequências socioeconômicas, incluindo altos custos médicos, ausência do trabalho e efeitos negativos na família e relacionamentos³⁷.

Potencial do uso de biomarcadores em psiquiatria

A FDA, companhias farmacêuticas e indústria de biotecnologia aceitaram agora que a adoção de plataformas baseadas em biomarcadores serão benéficas no desenvolvimento de mais e melhores diagnósticos e marcadores substitutos para a descoberta de drogas. Um biomarcador é definido como “característica mensurável que reflete processos fisiológicos, farmacológicos ou de doença” (Agência de Medicina Europeia; <http://www.emea.europa.eu>). No caso de biomonitoramento, um biomarcador é a presença de qualquer substância ou uma mudança em qualquer estrutura biológica ou processo que possa ser medido como resultado de exposição (Bio-monitoringinfo.org/glossary). No caso de condições psiquiátricas, há muitos benefícios esperados (Tabela 1).

Tabela 1. Benefícios potenciais de biomarcadores em desordens psiquiátricas

Diagnóstico precoce e decisões de tratamento
Melhor prognóstico e economia do sistema de saúde
Diferenciação de desordens psiquiátricas de outras condições potencialmente confundidas
Auxílio nas decisões de tratamento clínico
Abordagens de medicina estratificadas
Predição de resposta à terapêutica específica
Seleção da droga certa para o paciente certo
Predição de quais pacientes desenvolverão efeitos colaterais específicos (ganho de peso, resistência à insulina, agranulocitose)
Monitoramento de paciente
Teste para normalização de biomarcadores após tratamento (eficácia)
Teste precoce para reaparecimento de assinatura na recorrência de sintomas
Teste de concordância médica
Teste precoce de efeitos colaterais
Desenvolvimento de abordagens de intervenção da doença
Predição de populações de alto risco e teste de tratamentos profiláticos

Atualmente, somente poucos biomarcadores têm sido usados no campo de desordens psiquiátricas. Por exemplo, o teste de resposta de lavagem de pele com niacina^{38,39} tem sido usado esporadicamente por diversos anos para o diagnóstico de esquizofrenia⁴⁰. Isso funciona pelo fato de que alguns pacientes com esquizofrenia exibem reduzida resposta à lavagem de pele à aplicação de niacina. Mais recentemente, biomarcadores genômicos incluindo variantes de enzimas citocromo hepático p450 têm sido usadas para predição de toxicidade em subpopulações específicas em resposta a tratamentos antipsicóticos⁴¹. Também variados polimorfismos em transportadores serotoninérgicos e genes receptores foram associados à resposta a antidepressivos baseados em inibidores seletivos de reabsorção de serotonina⁴².

Há somente poucos testes moleculares que predizem resposta farmacodinâmica e eles são principalmente restritos ao campo da oncologia. Um bom exemplo disso é o teste para a expressão do gene *Her2* em células de câncer de mama. Esse é um receptor de superfície celular que pode ser bloqueado por terapêutica baseada em anticorpo chamado Herceptin^{TM43} (Tabela 2).

Tabela 2. Testes de biomarcadores usados em outras indicações

Expressão de <i>Her2</i> em câncer de mama ⁴³
Proteína humana gonadotrofina coriônica e gravidez ⁴⁴
Teste Triplo/Teste Quad em síndrome de Down ⁴⁵
Estriol, β-HCG, alfafetoproteína
Estriol, β-HCG, alfafetoproteína, inibina
Teste de saúde OncoDx para câncer de mama ⁴⁶
21 genes para predição de melhor tratamento
Hemoglobina glicosilada e frutossamina sérica em diabetes tipo II ⁴⁷

É evidente que a próxima fase para a psiquiatria deveria incluir o desenvolvimento de um sistema diagnóstico que seja baseado nos fundamentos da fisiopatologia, como tem sido o caso para a maioria das outras áreas da medicina. Para esse fim, desenvolvemos recentemente um teste sanguíneo de biomarcadores (VeriPsychTM) baseado em um algoritmo de 51 biomarcadores moleculares, que foi lançado agora nos Estados Unidos^{5,48}. Esse é o primeiro teste sanguíneo de biomarcadores com uma aplicação diagnóstica que entrou na prática clínica.

Um problema que encontramos no desenvolvimento desse teste relaciona-se ao fato de que as populações-alvo dos pacientes foram selecionadas e classificadas de acordo com o critério DSM-IV, o qual algumas vezes é questionável, como discutido anteriormente. Sendo assim, nossos estudos iniciais envolveram a seleção sistemática de pacientes com respeito à psicopatologia e ao estágio de doença com um foco em pacientes com esquizofrenia paranoica, os quais estavam na sua maioria no primeiro episódio da doença e livres de drogas. Além disso, indivíduos com qualquer comorbidade foram excluídos e pacientes foram pareados com indivíduos controle apresentando similar *background* socioeconômico e *status* educacional. Em adição, os pacientes foram monitorados por diversos anos para confirmar a doença e a estabilidade dos sintomas ao longo do tempo. No momento da coleta de amostras, os pacientes foram avaliados por meio da Escala de Síndrome Positiva Negativa (PANSS), DSM-IV e outros sistemas de classificação. Indivíduos controle também foram avaliados por meio de DSM-IV. No estágio inicial da fase de testes, analisamos amostras de clínicas independentes na Alemanha, já que elas usavam procedimentos operacionais padrões idênticos para aquisição e armazenamento de amostras, e também estabelecemos um interclassificador de fidelidade entre os diferentes lugares.

Essa abordagem permitiu estabelecer os níveis de expressão de aproximadamente 200 proteínas e pequenas moléculas em amostras séricas de todos os indivíduos. Esses foram então usados para selecionar moléculas que mostraram mais significativa associação com o diagnóstico de esquizofrenia paranoide. Também testamos amostras séricas de pacientes com desordem bipolar conformada, desordem depressiva maior e síndrome de Asperger, o que permitiu estabelecer uma assinatura específica para esquizofrenia de 34 moléculas⁴⁸. Posteriormente, 17 dessas moléculas foram adicionadas, o que permitiu discriminação contra desordem bipolar e desordem depressiva maior para propósitos de diagnóstico diferencial. Após isso, descobrimos que o mesmo teste funcionava mesmo quando usando amostras não tão bem caracterizadas de pacientes tratados com drogas e pacientes caracterizados como crônicos ou de maneira mais geral com esquizofrenia.

A especificidade do teste foi alcançada usando um algoritmo que compreendia múltiplas moléculas. Esse algoritmo foi treinado para identificar moléculas associadas com esquizofrenia, e então fomos capazes de identificar diferenças moleculares estáveis em populações de pacientes. Por meio de estudos de pacientes de primeira ordem,

descobrimos que a maioria dos pacientes com esquizofrenia tem diferenças nos níveis de moléculas insulino-relacionadas²⁸, outros hormônios do sistema neuroendócrino difuso⁴⁹, fatores inflamatórios^{5,50} e moléculas associadas com função celular endotelial⁴⁸. Espera-se que a determinação de quais desses fatores estejam alterados em cada indivíduo venha a ser útil para a estratificação do paciente anteriormente ao tratamento antipsicótico.

A história de testes sanguíneos de biomarcadores para desordens psiquiátricas

O sangue tem sido reconhecido como uma fonte de informações sobre saúde e doença desde os tempos antigos. Com o aparecimento de técnicas médicas experimentais na metade do século XIX, estudos sanguíneos de pessoas com doenças psiquiátricas foram realizados para identificar quaisquer características físicas que pudessem ser usadas para distinguir o doente do saudável ou para saber se poderiam ser usadas para confirmar um conjunto de entidades doenças naturais discretas que pudessem ser classificadas em categorias clínicas. A história desses estudos na psiquiatria nos últimos 150 anos compreendeu quatro principais fases (ver Noll⁵¹ para uma contagem mais completa).

A primeira fase foi descrita como paradigma da riqueza corpuscular (1854). Investigações microscópicas da morfologia de células sanguíneas em pacientes psiquiátricos foram conduzidas em um sanatório escocês por W. Lauder Lindsey. Usando um microscópio de baixo poder, ele examinou e contou o número de diferentes células sanguíneas em amostras de seus pacientes e equipe. Entretanto, esse trabalho chegou à conclusão de que “insanidade e os seus diferentes tipos e fases não são caracterizados por um estado particular de morbidade do sangue”. S. Rutherford Macphail (1884)⁵² revisou estudos subsequentes e concluiu que havia uma “deficiência global da riqueza corpuscular do sangue nos primeiros estágios de insanidade”. Estudos similares foram realizados ao longo das duas primeiras décadas do século XX.

A próxima fase foi chamada de paradigma metabólico (circa 1895). Ao longo dessa fase, o sangue foi usado para detectar e “medir secreções interiores” de “órgãos secretores”, particularmente de glândulas sem ductos como a tireoide, adrenais e pituitária. Após 1905, essas secreções internas ficaram conhecidas como hormônios, da palavra Grega *ὄρμη*, significando “impeto”. Esse novo paradigma emergente foi imediatamente apoderado pelos “modernos” psiquiatras, os quais procuravam uma nova direção para estudos de indivíduos com doenças psiquiátricas. Pensou-se que uma produção exacerbada ou reduzida de secreções internas poderia causar doenças psiquiátricas da mesma maneira que o diabetes era causado pela falta de uma “secreção interna”, como suspeitado nos anos 1890 (identificada como insulina em 1921). Isso levou à afirmação do psiquiatra alemão Emil Kraepelin (1856-1926) de que a severa desordem psiquiátrica que ele descreveu como “*dementia praecox*” (em 1896) era o resultado de uma doença metabólica sistêmica em ocorrência, afetando o córtex cerebral e resultando em uma deterioração mental crônica⁵³. Em 1908, o psiquiatra suíço Eugen Bleuler (1857-1939) propôs que a esquizofrenia era uma expansão dessa desordem, e o termo “esquizofrenia” se tornou mais usado, e não o conceito original da doença por Kraepelin. Por mais de um século mudanças na função da pituitária e anormalidades hormonais relacionadas em várias desordens psiquiátricas têm sido estabelecidas e permanecem como um achado biológico importante atualmente.

A terceira fase foi chamada de o paradigma “imunossorod diagnóstico” (1906). O desenvolvimento do teste de reação de Wasserman para a neurosífilis foi a primeira grande descoberta na biologia psiquiátrica. Esse foi o primeiro teste sanguíneo para uma discreta forma de insanidade observada em sanatórios. Em 1909, dois psiquiatras alemães injetaram veneno de cobra em pacientes com demência precoce e insanidade maniaco-depressiva e relataram que todos do primeiro caso e alguns do último apresentaram reações à toxina, e nenhuma reação foi observada em indivíduos saudáveis. Entretanto, esses achados não puderam ser replicados e foram eventualmente

refutados. Um teste muito mais influente foi desenvolvido pelo proeminente bioquímico suíço Emil Abderhalden (1877-1950). Também, um “teste de reação de fermentos defensivos” foi desenvolvido pelo psiquiatra alemão August Fauser (1856-1938), o qual diagnosticou demência precoce comparada à insanidade maniaco-depressiva e indivíduos saudáveis ao longo de uma série de estudos. De 1912-1920 acreditaram que um teste sanguíneo para a loucura havia sido encontrado. Entretanto, uma série de estudos foi publicada, mas estes não verificaram a existência de fermentos defensivos, e o teste foi posto em dúvida. Ao longo do século XX, alterações na função imune e inflamação foram ligadas a várias desordens psiquiátricas por diversas linhas de evidência.

O estágio final foi referido como o paradigma da medicina genômica (2005)/pós-genômica (2010). Nesse estágio, testes sanguíneos que têm por alvo o genoma e o proteoma têm sido usados. Entretanto, tentativas para especificar a maioria das desordens psiquiátricas no nível genômico têm se provado inefetivas. Isso poderia ser devido à falta de certeza de quão fortes as contribuições genéticas e ambientais realmente são e de como elas interagem para precipitar o início da doença. Apesar de 20 anos de investigações intensivas, nenhum gene ou combinações de genes se mostrou significativamente relacionado à probabilidade de desenvolver esquizofrenia. Em 2009, resultados da *Genome-Wide Association Studies* (GWAS) foram publicados em três artigos na *Nature*⁵⁴⁻⁵⁶. Nenhum desses estudos identificou qualquer marcador genético que fosse associado com esquizofrenia. Entretanto, três regiões cromossômicas foram implicadas. A mais significativa delas foi o braço curto do cromossomo 6, que é a região de localização de genes do complexo de histocompatibilidade maior (MHC).

A necessidade da padronização de biomarcadores

O campo da proteômica clínica gerou grandes esperanças por meio de um número de relatos iniciais de biomarcadores em potencial. Entretanto, na maioria dos casos, eles não puderam ser validados em estudos subsequentes ou testes clínicos. Razões em potencial para a falha na incorporação dentro da clínica incluem problemas de desenho experimental, a possibilidade de que os biomarcadores pudessem não ser causais, e sim um resultado do processo da doença, uma falta de congruência nos modelos animais da doença e as condições humanas correspondentes, ou a prática de registro e recrutamento de pacientes em testes, os quais estão em diferentes estágios do processo da doença⁵⁷.

A ideia de que a pesquisa em biomarcadores não havia sobrevivido após a excitação inicial foi mostrada pelo número de chamados “avanços” nos biomarcadores que ainda deveriam alcançar o mercado. Com exceção de poucos biomarcadores usados na pesquisa de câncer, a maioria não havia sido validada. Entretanto, a maioria deles é usada apenas para monitorar a resposta a tratamento e não é adequada para o diagnóstico precoce, com exceção do antígeno específico de próstata⁵⁸.

A Organização do Proteoma Humano (HUPO), que surgiu a partir do Projeto Genoma Humano, desenvolveu diversas iniciativas objetivando contornar as questões relativas à irreprodutibilidade. Essas iniciativas são focadas em plasma, fígado, cérebro, análise proteômica/glicômica de doenças, biomarcadores de doenças, modelos de doença em camundongos, modelos de organismos, rim/urina, doença cardiovascular, células-tronco, a Iniciativa de Anticorpos Humanos e a Iniciativa de Padrões Proteômicos (<http://hupo.org/>). Cada um desses programas individualmente é baseado em um país e inclui subprojetos envolvendo laboratórios internacionais como parceiros. Esses projetos foram conduzidos porque a maior parte dos problemas relacionados à irreprodutibilidade pode resultar em variabilidade ao nível de amostra, tratamento de amostra, desenho experimental, questões técnicas e diferenças relacionadas ao usuário. Entretanto, um teste baseado em proteômica para câncer ovariano foi agora aprovado pelo FDA, demonstrando que o sucesso nessa área é possível⁵⁹.

O desenvolvimento e o uso de biomarcadores dispararam a necessidade pelo estabelecimento de procedimentos operacionais

padrão para ir ao encontro das exigências regulatórias. As agências reguladoras, em particular a FDA, consideram agora que os biomarcadores são importantes para o desenvolvimento de futuras drogas. Na Iniciativa do Caminho Crítico, a FDA produziu um relatório branco para a modernização de métodos, ferramentas e técnicas para facilitar o desenvolvimento de drogas mais eficientes e seguras^{2,3}. Os aspectos regulatórios de biomarcadores foram inicialmente descritos em uma orientação associada com a Submissão de Dados Farmacogênicos pela FDA (<http://www.fda.gov/OHRMS/DOCKETS/98fr/2003d-0497-gdl0002.pdf>)⁶⁰. Este destacou que moléculas requerem o *status* de biomarcadores validados (descrito acima) para serem usadas em tomadas de decisão regulamentadas, incluindo decisões em testes clínicos, regimes de dose e seleção de pacientes. Atualmente, apenas testes bem estabelecidos têm sido usados em decisões regulamentadas, tais como determinação de níveis de creatinina sérica para monitorar função renal e realização de testes de tolerância à glicose no jejum combinado com medidas de glicose e insulina para estabelecer sensibilidade à insulina^{61,62}.

Um exemplo de teste que foi desenvolvido em concordância com a qualificação dos processos de biomarcadores foi em biomarcadores de segurança em rins de ratos. Esses biomarcadores se tornaram parte de um estudo de validação cruzada e alcançaram o *status* de biomarcadores sabidamente válidos como parte do Consórcio de Testes de Predição Segura (PSTC; 2, 3). O PSTC foi fundado pela FDA para agir como uma ligação entre a FDA e as companhias farmacêuticas e a academia na qualificação de biomarcadores para uso pré-clínico e clínico. O subgrupo de nefrotoxicidade do PSTC identificou sete biomarcadores renais seguros para uso limitado em desenvolvimento clínico e pré-clínico de drogas^{60,63}. Um Rat KidneyMAP™ foi desenvolvido agora como um imunoenensaio multiplexado pela Medicina Baseada em Regras em colaboração com o PSTC para a detecção precoce de dano renal, que é comum nos programas de desenvolvimento de drogas (<http://www.rulesbasedmedicine.com/products-services/rodentmap-services/rat-kidneymap/>)⁶⁴.

Talvez a estratégia mais útil para a qualificação de biomarcadores seja por meio do codesenvolvimento com drogas⁶⁵. Essa estratégia foi primeiramente descrita em guia-rascunho emitido pela FDA [US Department of Health and Human Services, FDA (2005) *Drug-Diagnostic Co-Development Concept Paper* (<http://www.fda.gov/cder/genomics/pharmacconceptfn.pdf>)]. A ideia por trás desse rascunho é que o aumento do conhecimento da biologia que cerca um biomarcador em particular e uma forte associação entre biomarcador e a consequência clínica levarão a um processo de desenvolvimento mais eficiente, com menores riscos. Também, a interação precoce com agências regulatórias relevantes é essencial para que, assim, os estudos sejam programados e os testes de biomarcadores sejam realizados corretamente.

O desenvolvimento de ensaios de biomarcadores para desordens psiquiátricas

As autoridades de saúde europeias deram apoio ao desenvolvimento e à implementação de biomarcadores por intermédio de agências, tais como a Iniciativa de Medicamentos Inovadores^{66,67}. Essa iniciativa é uma parceria entre a Comissão Europeia e companhias farmacêuticas com o objetivo de promover uma mais eficiente identificação e desenvolvimento de medicamentos. Um dos principais objetivos é a identificação de biomarcadores tradicionais, incluindo aqueles para condições psiquiátricas como desordens do espectro de esquizofrenia e autismo. A Comissão Europeia destinou 1 bilhão de euros para esse programa, e esse montante foi alcançado por gentis contribuições de companhias pertencentes à Federação Europeia de Indústrias e Associações Farmacêuticas (EFPIA).

Ensaio diagnóstico nos Estados Unidos são regulados pela Alterações de Melhoras em Clínica Laboratorial (CLIA; <http://www.fda.gov/MedicalDevices/DeviceRegulationandGuidance/IVDRRegulatoryAssistance/ucm124105.ht>). Esses padrões regulatórios federais governam qualquer teste em um laboratório clínico em amostras humanas com o objetivo de diagnóstico, prevenção de doenças, tra-

tamento ou verificação de saúde. Testes disponíveis comercializados de acordo com a CLIA são categorizados pela FDA em três grupos, dependendo do potencial de risco para a saúde. Essa categorização considera o conhecimento necessário, treinamento, materiais e julgamento para conduzir tais testes e outros fatores, incluindo procedimentos operacionais, de manutenção e controle de qualidade. Por outro lado, aos testes pode ser dado o abandono caso sejam precisos, básicos, excluam interpretações errôneas e não coloquem a saúde humana em risco caso sejam interpretados incorretamente.

O desenvolvimento de ensaios diagnósticos para todas as doenças incluindo as desordens psiquiátricas requer a repetida demonstração de características de *performance* específicas, incluindo precisão, sensibilidade e especificidade. Esses fatores são agora considerados requerimentos absolutos para experimentos, já que a variabilidade nas medidas de biomarcadores pode ser afetada por fatores biológicos, ambientais, de coleta de amostra e analíticos. O desenvolvimento de imunoenaios multiplexados, por exemplo, requer a validação da estrutura do ensaio e da *performance* analítica para maximizar a precisão e a fidelidade. Nesse caso, os desafios associados incluem a seleção e a imobilização de ligantes de captura, calibração, compatibilidade antígeno-anticorpo, faixa dinâmica e limites de detecção⁶⁸.

É aceito agora que biomarcadores únicos pouco provavelmente são efetivos, dada a complexidade da maioria das doenças, particularmente das desordens psiquiátricas⁶⁹. Também, a maioria das condições psiquiátricas aparentemente é o resultado de uma complexa interação entre fatores ambientais e genéticos⁷⁰. Sendo assim, um painel de biomarcadores deve ser empregado para refletir a complexidade e aumentar a especificidade das medidas. Tal painel de biomarcadores deve consistir de moléculas rigorosamente validadas em centros múltiplos e ao longo de diferentes tempos, de forma a prover testes reprodutíveis e precisos.

Painéis de biomarcadores devem ser também específicos para doenças, pelo menos relativamente a outras doenças com sintomas similares. Mais uma vez, isso é particularmente difícil para desordens psiquiátricas, já que elas podem ter muitas áreas de sobreposição de sintomas comportamentais subjetivamente avaliados. Exemplos disso são a sobreposição dos sintomas negativos entre desordem depressiva maior e esquizofrenia⁷¹, a similaridade nos sintomas psicóticos entre desordem bipolar maníaca e esquizofrenia⁷² e os sintomas de déficit cognitivo partilhados entre todas essas condições⁷³. Em adição, condições como desordem bipolar podem consistir de múltiplos estágios considerando o ciclo de mania e depressão⁷². A identificação de biomarcadores válidos que pudessem prever a mudança entre estágios seria inestimável.

Finalmente, testes de biomarcadores devem ser em um formato de alta resposta, precisos e amigáveis ao usuário para permitir seu uso por clínicos, equipe hospitalar e cientistas. Espectrometria de massas e eletroforese bidimensional seriam demasiado incômodas e requereriam muita experiência para serem consideradas como possibilidades realísticas. Em vez disso, plataformas automatizadas como o sistema de imunoenensaio multiplexado e a reação de monitoramento múltiplo⁷⁴ são candidatas mais prováveis como plataformas clinicamente amigáveis que já demonstraram sinais favoráveis. Também sensores holográficos já foram empregados para detecção de materiais biológicos⁷⁵ e moléculas⁷⁶⁻⁷⁸ e poderiam, dessa forma, ser adaptados como uma forma de leitura de uma assinatura de biomarcadores em aplicações clínicas.

Desenvolvimento de um teste molecular sanguíneo para a esquizofrenia

Ao longo da última década, a maioria dos estudos proteômicos baseados em biomarcadores ligados à esquizofrenia tem sido realizada tendo como alvo apenas uma ou poucas moléculas. Entretanto, ao longo dos últimos dois ou três anos, uma abordagem mais compreensiva tem sido aplicada usando espectrometria de massas acoplada a cromatografia líquida e plataformas de perfil por imunoenensaio multiplexado, os quais são direcionados a dezenas ou centenas de proteínas simultaneamente. Desenvolvemos recentemente o primeiro

teste para biomarcadores por meio de imunoenensaio multiplexado (VeriPsych™) para distúrbios psiquiátricos, em colaboração com a Medicina Baseada em Regras e a Psynova Neurotech^{5,48}. Esse sistema de ensaio foi lançado em 2010 como um teste aprovado pela CLIA para auxiliar no diagnóstico de esquizofrenia. Esse ensaio emprega um algoritmo proprietário para alcançar uma sensibilidade de 83% e especificidade de 83%. É esperado que esse teste de biomarcadores possa ser empregado em estágios múltiplos do processo da esquizofrenia para melhorar a vida dos pacientes (Figura 2).

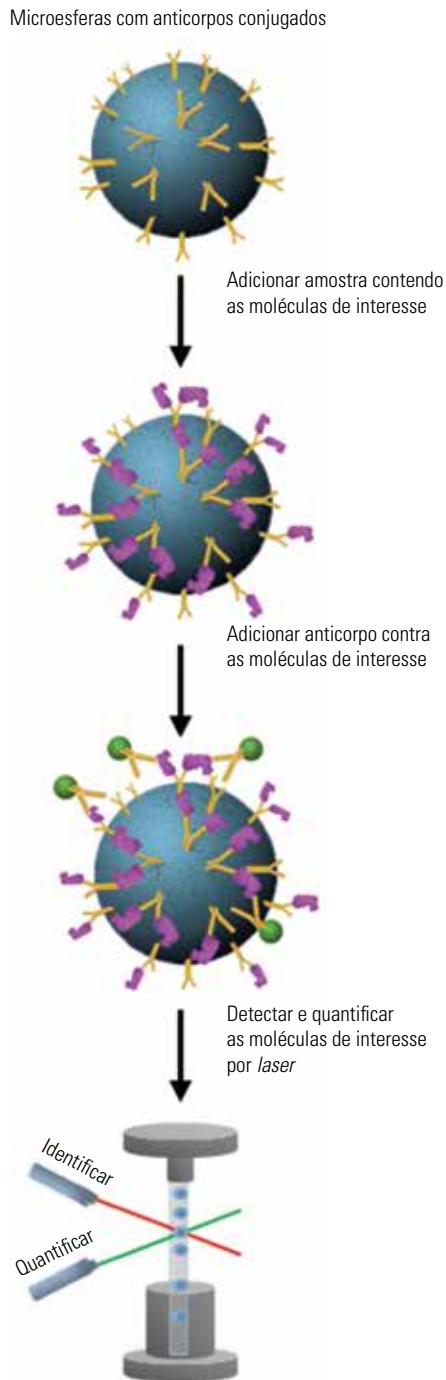


Figure 2. Diagrama esquemático do sistema de imunoenensaio multiplexado para esquizofrenia. Medida de uma única molécula-alvo é indicada. Em ensaios atuais, múltiplas moléculas-alvo (conjugado anticorpo-microesfera) são medidas simultaneamente, e o uso do sistema *laser* pode identificar e quantificar moléculas.

Análises decisão-modeladas foram realizadas para construir um caso socioeconômico para um teste baseado em biomarcadores tal como o VeriPsych para o diagnóstico precoce de esquizofrenia e para determinar a prospectiva de mercado⁷⁹. Isso mostrou que, no Reino Unido, o custo de cada paciente diagnosticado após o primeiro episódio psicótico seria de aproximadamente £ 182.000 ao longo de um período de cinco anos. Entretanto, o custo para um paciente diagnosticado precocemente seria em torno de £ 27.000, indicando uma potencial economia de seis a sete vezes. Isso sugere que há uma boa razão socioeconômica para a introdução de melhores ferramentas diagnósticas para a detecção de esquizofrenia durante a fase prodromal.

Psiquiatras e profissionais da saúde têm, até o momento, visto esse teste com reações mistas. A maioria concorda que um teste sanguíneo e específico para distúrbios psiquiátricos seria muito bem-vindo e um grande avanço no campo, embora muitos sejam resistentes em usar tal teste clínico na prática. Uma crítica justificada e específica do atual teste sanguíneo é que foi desenvolvido para distinguir pacientes esquizofrênicos de indivíduos saudáveis, e não como um diagnóstico diferencial para outras distúrbios psiquiátricos. Entretanto, a próxima versão do teste tentará contornar essa desvantagem, incluindo uma capacidade diagnóstica diferencial de esquizofrenia comparada à distúrbio depressiva maior e à distúrbio bipolar. Nossa pesquisa de mercado mostrou que os psiquiatras, em sua maioria, acreditam que são bons ao diagnosticar pacientes esquizofrênicos usando uma entrevista clínica básica. Entretanto, eles constantemente sentem que outros colegas profissionais são menos capazes de alcançar o correto diagnóstico. Em adição ao auxílio ao diagnóstico para os psiquiatras, uma posterior aplicação do teste pode ser para melhorar pontos de vista e aceitação da doença pelos pacientes, como descrito recentemente em um relato anedotal⁸⁰. Atualmente, a falta de evidência objetiva leva muitos pacientes a terem pouca confiança em seus diagnósticos. Essa aplicação pode alargar a utilidade clínica do teste.

Conclusões

Este capítulo descreveu desafios e recentes sucessos associados com a descoberta e o desenvolvimento de biomarcadores sanguíneos para distúrbios psiquiátricos. O atual processo diagnóstico e estratégias para o desenvolvimento de novos compostos farmacêuticos necessitam de uma mudança de paradigma. Apesar disso, há relutância em aceitar a ideia de que biomarcadores serão de qualquer ajuda nessa tarefa⁸¹. É verdade que somente uns poucos dos milhares de biomarcadores promissores identificados sobreviveram ao entusiasmo inicial. Entretanto, autoridades regulatórias de saúde agora consideram a identificação, a validação e a implementação de biomarcadores de crítica importância para a descoberta de futuras drogas. Como resultado, elas agora chamaram esforços para a modernização de métodos, ferramentas e técnicas para alcançar esse objetivo. Dada a complexa natureza e a baixa abundância de muitos biomarcadores proteômicos, isso provavelmente requererá o desenvolvimento de métodos mais sensíveis e reprodutíveis e uma massiva integração de tecnologias. Entretanto, agora há razão para otimismo de que posteriores avanços tecnológicos e abordagens interdisciplinares contornarão as limitações atuais no campo dos biomarcadores para auxiliar na condução do estudo de distúrbios psiquiátricos inteiramente no século XXI.

Agradecimentos

Esta pesquisa foi apoiada pelo Instituto Médico Stanley (SMRI), pelo programa de pesquisa FP7 SchizDX da União Europeia (referência de projeto 223427) e pela Iniciativa de Medicamentos Inovadores NEWMEDS. Também agradecemos Enrique Millan, pela pesquisa acumulada ao seu projeto individual de MBA intitulado "O valor de mercado do diagnóstico da esquizofrenia", realizado com a Judge Business School na Universidade de Cambridge e Psynova Neurotech em Cambridge UK.

Referências

- Schaffer D. A participant's observations: preparing DSM-IV. *Can J Psychiatry*. 1996;41:325-9.
- Ovens J. Funding for accelerating drug development initiative critical. *Nat Rev Drug Discov*. 2006;5:271.
- Marson B. "Critical Path" is on the road forward; FDA reports industry activity is high. *The Pink Sheet*. 2007;69:29.
- Goodsaid F, Frueh FW. Implementing the U.S. FDA guidance on pharmacogenomic data submissions. *Environ Mol Mutagen*. 2007;48:354-8.
- Schwarz E, Izmailov R, Spain M, Barnes A, Mapes JP, Guest PC, et al. Validation of a blood-based laboratory test to aid in the confirmation of a diagnosis of schizophrenia. *Biomark Insights*. 2010;5:39-47.
- Tsuang MT. Heterogeneity of schizophrenia. *Biol Psychiatry*. 1975;10:465-74.
- Gonzalez-Pinto A, Gutierrez M, Mosquera F, Ballesteros J, Lopez P, Ezcurra J, et al. First episode in bipolar disorder: misdiagnosis and psychotic symptoms. *J Affect Disord*. 1998;50:41-4.
- Follette WC, Houts AC. Models of scientific progress and the role of theory in taxonomy development: a case study of the DSM. *J Consult Clin Psychol*. 1996;64:1120-32.
- Wakefield JC. Misdiagnosing normality: psychiatry's failure to address the problem of false positive diagnoses of mental disorder in a changing professional environment. *J Ment Health*. 2010;19:337-51.
- Strakowski SM, Keck PE Jr, Arnold LM, Collins J, Wilson RM, Fleck DE, et al. Ethnicity and diagnosis in patients with affective disorders. *J Clin Psychiatry*. 2003;64:747-54.
- Cheniaux E, Landeira-Fernandez J, Versiani M. The diagnoses of schizophrenia, schizoaffective disorder, bipolar disorder and unipolar depression: interrater reliability and congruence between DSM-IV and ICD-10. *Psychopathology*. 2009;42:293-8.
- Yolken RH, Dickerson FB, Fuller Torrey E. Toxoplasma and schizophrenia. *Parasite Immunol*. 2009;31:706-15.
- Lovatt A, Mason O, Brett C, Peters E. Psychotic-like experiences, appraisals, and trauma. *J Nerv Ment Dis*. 2010;198:813-9.
- Bagby RM, Rogers R, Buis T, Nicholson RA, Cameron SL, Rector NA, et al. Detecting feigned depression and schizophrenia on the MMPI-2. *J Pers Assess*. 1997;68:650-64.
- Robins E, Guze SB. Establishment of diagnostic validity in psychiatric illness: its application to schizophrenia. *Am J Psychiatry*. 1970;126:983-7.
- Schwartz JE, Fennig S, Tanenberg-Karant M, Carlson G, Craig T, Galambos N, et al. Congruence of diagnoses 2 years after a first-admission diagnosis of psychosis. *Arch Gen Psychiatry*. 2000;57:593-600.
- Castagnini A, Bertelsen A, Berrios GE. Incidence and diagnostic stability of ICD-10 acute and transient psychotic disorders. *Compr Psychiatry*. 2008;49(3):255-61.
- Clayton PJ, Guze SB, Cloninger CR, Martin RL. Unipolar depression: diagnostic inconsistency and its implications. *J Affect Disord*. 1992;26:111-6.
- Bromet EJ, Kotov R, Fochtmann LJ, Carlson GA, Tanenberg-Karant M, Ruggero C, et al. Diagnostic shifts during the decade following first admission for psychosis. *Am J Psychiatry*. 2011;168(11):1186-94.
- Torrey EF. Are we overestimating the genetic contribution to schizophrenia? *Schizophr Bull*. 1992;18:159-70.
- McGue M. When assessing twin concordance, use the probandwise not the pairwise rate. *Schizophr Bull*. 1992;18:171-6.
- Tsuang M. Schizophrenia: genes and environment. *Biol Psychiatry*. 2000;47:210-20.
- Dauncey MJ, Bicknell RJ. Nutrition and neurodevelopment: mechanisms of developmental dysfunction and disease in later life. *Nutr Res Rev*. 1999;12:231-53.
- Schlotz W, Phillips DI. Fetal origins of mental health: evidence and mechanisms. *Brain Behav Immun*. 2009;23:905-16.
- Koenig JI, Kirkpatrick B, Lee P. Glucocorticoid hormones and early brain development in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*. 2002;27:309-18.
- Ryan MC, Collins P, Thakore JH. Impaired fasting glucose tolerance in first-episode, drug-naive patients with schizophrenia. *Am J Psychiatry*. 2003;160:284-9.
- Spelman LM, Walsh PI, Sharifi N, Collins P, Thakore JH. Impaired glucose tolerance in first-episode drug-naive patients with schizophrenia. *Diabet Med*. 2007;24:481-45.
- Guest PC, Wang L, Harris LW, Burling K, Levin Y, Ernst A, et al. Increased levels of circulating insulin-related peptides in first-onset, antipsychotic naive schizophrenia patients. *Mol Psychiatry*. 2010;15:118-9.
- Szulc A, Galińska B, Konarzewska B, Gudel-Trochimowicz I, Popławska R. Immunological marker activity in first episode schizophrenic patients. *Pol Merkuri Lekarski*. 2001;10:450-2.
- Van Venrooij JA, Fluitman SB, Lijmer JG, Kavelaars A, Heijnen CJ, Westenberg HG, et al. Impaired neuroendocrine and immune response to acute stress in medication-naive patients with a first episode of psychosis. *Schizophr Bull*. 2012;38(2):272-9.
- Schwarz E, Guest PC, Rahmoune H, Martins-de-Souza D, Niebuhr DW, Weber NS, et al. Identification of a blood-based biological signature in subjects with psychiatric disorders prior to clinical manifestation. *World J Biol Psychiatry*. 2011. (in press)
- Agius M, Shah S, Ramkissoon R, Murphy S, Zaman R. Three year outcomes of an early intervention for psychosis service as compared with treatment as usual for first psychotic episodes in a standard community mental health team. Preliminary results. *Psychiatr Danub*. 2007;19:10-9.
- Salokangas RK, McGlashan TH. Early detection and intervention of psychosis. A review. *Nord J Psychiatry*. 2008;62:92-105.
- Yap HL. Early psychosis intervention. *Singapore Med J*. 2010;51:689-93.
- Thomas P. The many forms of bipolar disorder: a modern look at an old illness. *J Affect Disord*. 2004;79(Suppl 1):S3-8.
- Hirschfeld RM. Bipolar spectrum disorder: improving its recognition and diagnosis. *J Clin Psychiatry*. 2001;62(Suppl 14):5-9.
- Post RM. The impact of bipolar depression. *J Clin Psychiatry*. 2005;66(Suppl 5):5-10.
- Kashshai D, Mate B. The effect of nicotinic acid on the temperature of the skin of patients with schizophrenia in different states. *Zh Nevropatol Psikiatr Im S S Korsakova*. 1961;61:1688-98.
- Vaddadi KS. Niacin flushing and schizophrenia. *Med Hypotheses*. 1981;7:599-600.
- Wilson DW, Douglass AB. Niacin skin flush is not diagnostic of schizophrenia. *Biol Psychiatry*. 1986;21:974-7.
- Fleeman N, Dundar Y, Dickson R, Jorgensen A, Pushpakom S, McLeod C, et al. Cytochrome P450 testing for prescribing antipsychotics in adults with schizophrenia: systematic review and meta-analyses. *Pharmacogenomics J*. 2010;11:1-14.
- Kato M, Serretti A. Review and meta-analysis of antidepressant pharmacogenetic findings in major depressive disorder. *Mol Psychiatry*. 2010;15:473-500.
- Desmedt C, Sperinde J, Piette F, Huang W, Jin X, Tan Y, et al. Quantitation of HER2 expression or HER2:HER2 dimers and differential survival in a cohort of metastatic breast cancer patients carefully selected for trastuzumab treatment primarily by FISH. *Diagn Mol Pathol*. 2009;18:22-9.
- Spadoni LR, Mclean RB, Herrmann WL. A rapid immunological test for the detection of early pregnancy. *West J Surg Obstet Gynecol*. 1964;72:92-7.
- Ball RH, Caughey AB, Malone FD, Nyberg DA, Comstock CH, Saade GR, et al. First and Second Trimester Evaluation of Risk (FASTER) Research Consortium. First- and second-trimester evaluation of risk for Down syndrome. *Obstet Gynecol*. 2007;110(1):10-7.
- Cronin M, Sangli C, Liu ML, Pho M, Dutta D, Nguyen A, et al. Analytical validation of the Oncotype DX genomic diagnostic test for recurrence prognosis and therapeutic response prediction in node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer. *Clin Chem*. 2007;53(6):1084-91.
- Howey JE, Bennet WM, Browning MC, Jung RT, Fraser CG. Clinical utility of assays of glycosylated haemoglobin and serum fructosamine compared: use of data on biological variation. *Diabet Med*. 1989;6(9):793-6.
- Schwarz E, Guest PC, Rahmoune H, Harris LW, Wang L, Leweke FM, et al. Identification of a biological signature for schizophrenia in serum. *Mol Psychiatry*. 2012;17(5):494-502.
- Guest PC, Schwarz E, Krishnamurthy D, Harris LW, Leweke FM, Rothermundt M, et al. Altered levels of circulating insulin and other neuroendocrine hormones associated with the onset of schizophrenia. *Psychoneuroendocrinology*. 2011;36(7):1092-6.
- Steiner J, Jacobs R, Panteli B, Brauner M, Schiltz K, Bahn S, et al. Acute schizophrenia is accompanied by reduced T cell and increased B cell immunity. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 2010;260:509-18.
- Noll R. The blood of the insane. *Hist Psychiatry*. 2006;17:395-418.
- Macphail SR. Clinical observations on the blood of the insane. *Br J Psychiatry*. 1884;30:378-89.
- Noll R. American madness: the rise and fall of dementia praecox. Cambridge: Harvard University Press; 2011.

54. Purcell SM, Wray NR, Stone JL, Visscher PM, O'Donovan MC, Sullivan PF, et al.; International Schizophrenia Consortium (2009) Common polygenic variation contributes to risk of schizophrenia and bipolar disorder. *Nature*. 2009;460:748-52.
55. Shi J, Levinson DF, Duan J, Sanders AR, Zheng Y, Pe'er I, et al. Common variants on chromosome 6p22.1 are associated with schizophrenia. *Nature*. 2009;460:753-7.
56. Stefansson H, Ophoff RA, Steinberg S, Andreassen OA, Cichon S, Rujescu D, et al. Common variants conferring risk of schizophrenia. *Nature*. 2009;460:744-7.
57. Flood DG, Marek GJ, Williams M. Developing predictive CSF biomarkers-A challenge critical to success in Alzheimer's disease and neuropsychiatric translational medicine. *Biochem Pharmacol*. 2011;81(12):1422-34.
58. Gjertson CK, Albertsen PC. Use and assessment of PSA in prostate cancer. *Med Clin North Am*. 2011;95:191-200.
59. Zhang Z, Chan DW. The road from discovery to clinical diagnostics: lessons learned from the first FDA-cleared in vitro diagnostic multivariate index assay of proteomic biomarkers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2010;19:2995-9.
60. Dieterle F, Sistare F, Goodsaid F, Papaluca M, Ozer JS, Webb CP, et al. Renal biomarker qualification submission: a dialog between the FDA-EMA and Predictive Safety Testing Consortium. *Nat Biotechnol*. 2010;28:455-62.
61. Truglia JA, Livingston JN, Lockwood DH. Insulin resistance: receptor and post-binding defects in human obesity and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Med*. 1985;79:13-22.
62. Khristov V. Glucose clamping: a modern method for research on insulin secretion and resistance. *Vutr Boles*. 1986;25:32-9.
63. Ozer JS, Dieterle F, Troth S, Perentes E, Cordier A, Verdes P, et al. A panel of urinary biomarkers to monitor reversibility of renal injury and a serum marker with improved potential to assess renal function. *Nat Biotechnol*. 2010;28:486-94.
64. Swain A, Turton J, Scudamore CL, Pereira I, Viswanathan N, Smyth R, et al. Urinary biomarkers in hexachloro-1:3-butadiene-induced acute kidney injury in the female Hanover Wistar rat; correlation of α -glutathione S-transferase, albumin and kidney injury molecule-1 with histopathology and gene expression. *J Appl Toxicol*. 2011;31(4):366-77.
65. Goodsaid F, Frueh F. Process map proposal for the validation of genomic biomarkers. *Pharmacogenomics*. 2006;7:773-82.
66. Kamel N, Compton C, Middelveld R, Higenbottam T, Dahlén SE. The Innovative Medicines Initiative (IMI): a new opportunity for scientific collaboration between academia and industry at the European level. *Eur Respir J*. 2008;31:924-6.
67. Hunter AJ. The Innovative Medicines Initiative: a pre-competitive initiative to enhance the biomedical science base of Europe to expedite the development of new medicines for patients. *Drug Discov Today*. 2008;13:371-3.
68. Ellington AA, Kullo IJ, Bailey KR, Klee GG. Antibody-based protein multiplex platforms: technical and operational challenges. *Clin Chem*. 2010;56(2):186-93.
69. Boja ES, Jortani SA, Ritchie J, Hoofnagle AN, Tezak Z, Mansfield E, et al. The journey to regulation of protein-based multiplex quantitative assays. *Clin Chem*. 2011;57:560-7.
70. Dick DM. Gene-environment interaction in psychological traits and disorders. *Annu Rev Clin Psychol*. 2011;7:383-409.
71. Fleischhacker W. Negative symptoms in patients with schizophrenia with special reference to the primary *versus* secondary distinction. *Encephale*. 2000;26 Spec No 1:12-4.
72. Dunayevich E, Keck PE Jr. Prevalence and description of psychotic features in bipolar mania. *Curr Psychiatry Rep*. 2000;2:286-90.
73. Ferrier IN, Stanton BR, Kelly TP, Scott J. Neuropsychological function in euthymic patients with bipolar disorder. *Br J Psychiatry*. 1999;175:246-51.
74. Gallien S, Duriez E, Domon B. Selected reaction monitoring applied to proteomics. *J Mass Spectrom*. 2011;46:298-312.
75. Bhatta D, Christie G, Madrigal-González B, Blyth J, Lowe CR. Holographic sensors for the detection of bacterial spores. *Biosens Bioelectron*. 2007;23:520-7.
76. Kabilan S, Marshall AJ, Sartain FK, Lee MC, Hussain A, Yang X, et al. Holographic glucose sensors. *Biosens Bioelectron*. 2005;20:1602-10.
77. Sartain FK, Yang X, Lowe CR. Holographic lactate sensor. *Anal Chem*. 2006;78:5664-70.
78. Tan EV, Lowe CR. Holographic enzyme inhibition assays for drug discovery. *Anal Chem*. 2009;81:7579-89.
79. Millan E. The value of the schizophrenia diagnostic market. Masters of Business Administration Individual Project (Judge Business School, Cambridge University). MBA thesis; 2007.
80. Kelly D, Thedford S, Vyas G. A new blood-based diagnostic aid for schizophrenia. *Psychiatr Serv*. 2011;62:1107.
81. Poste G. Bring on the biomarkers. *Nature*. 2011;469:156-7.