

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Cirurgia e Anatomia

MARELAINE PRANDI

**Efeitos do antipsicótico olanzapina na reatividade *in vitro*
da aorta torácica de ratos**

Ribeirão Preto
2022

MARELAINE PRANDI

**Efeitos do antipsicótico olanzapina na reatividade *in vitro*
da aorta torácica de ratos**

Versão Original

Dissertação apresentada ao Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de mestre em Ciências médicas.

Área de Concentração: Clínica Cirúrgica

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto B. Evora

Ribeirão Preto

2022

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Prandi, Marelaine
Efeitos do antipsicótico olanzapina na reatividade *in vitro* da aorta torácica de ratos. Ribeirão Preto, 2022.
83 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Clínica Cirúrgica.

Orientador: Evora, Paulo Roberto Barbosa.

1. Esquizofrenia. 2. Doenças cardiovasculares. 3. Endotélio
4. Reatividade vascular. 5. Olanzapina. 6. Antipsicótico.

FOLHA DE APROVAÇÃO

PRANDI, Marelaine

Efeitos do antipsicótico olanzapina na reatividade *in vitro* da aorta torácica de ratos

Dissertação apresentada ao Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de mestre em Ciências médicas.

Área de concentração: Clínica Cirúrgica.

Aprovado em:/...../.....

Comissão Julgadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Dedicatória

Dedico essa pesquisa à Terezinha da Silva Pinto, moradora da primeira turma das casas terapêuticas do Hospital Psiquiátrico Santa Tereza de Ribeirão Preto e transferida após 30 anos para residência terapêutica em Ribeirão Preto. Uma história comovente cheia de desafios, conquistas, superações e grandes perdas.

Agradecimento

A Deus, por acalmar meu coração e me manter conectada ao universo.

Ao meu marido Oswaldo José Gola (*in memoriam*), que sempre motivou minha jornada como colaboradora da ciência.

Aos meus pais Alzira R. Prandi (*in memoriam*) e Orany José Prandi pelos ensinamentos e amor.

Às minhas irmãs Elaine e Roselaine pelo amor, carinho e ajuda, e principalmente minha amada irmã Joselaine que, por sua existência e amor nunca soltou das minhas mãos nos momentos que me deparava com meu próprio abismo.

Aos meus filhos, Melmoara, Jade e Ianco, que me ajudaram e tiveram paciência nos momentos mais difíceis durante esse processo.

Ao meu neto Antônio, que só pelo fato de existir, me faz amar mais a vida.

Ao meu orientador professor Paulo Roberto Barbosa Evora, pelo carinho e dedicação durante esses anos de pesquisa.

À professora Andréa Carla Celotto pela força, ensinamento e ajuda, acrescentando conhecimentos a cada nova etapa dessa pesquisa.

Aos amigos que fiz aqui e levarei para vida toda, Jéssyca, Carlos, Cecília, Claudinha e Tauana, que foram fundamentais nos momentos de alegria e tristeza, me acalentando e ajudando a clarear o caminho.

Ao mestre Willian Márcio da Silva por me mostrar sempre o caminho das pedras.

À minha amiga Marielen Ronconi por ajudar a lembrar de mim mesma quando eu me esquecia.

À secretária do Departamento de Cirurgia e Anatomia da FMRP Juliana Pischiottin da Silva Moraes, que sempre me orientou com clareza, atenção e dedicação.

À amiga Vanessa S. Nakagi, uma amiga que levo para vida. Conte sempre comigo.

Ao biotério Central da FMRP, principalmente ao Renaldo, nos proporcionando os ratos necessários para desenvolver essa pesquisa. Estávamos no ápice da pandemia Covid-19.

À profissional e amiga Agnes Afrodite S. Albuquerque Fagundes, técnica do laboratório de Cirurgia Cardiovascular. Só tenho a agradecer de todo coração pela amizade, entrega e dedicação. Sem você nada aconteceria, dominou toda técnica necessária para que o funcionamento de todos instrumentos e materiais mantivessem sincronicidade.

Agradeço aos animais, ratos hannover, pois sem eles essa pesquisa não seria possível.

Às agencias: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do HCFMRP-USP (FAEPA).

Epígrafe

"Nós somos o que fazemos do que fazem de nós".

Jean-Paul Sartre Apud Marcondes

RESUMO

PRANDI, Marelaine. **Efeitos do antipsicótico olanzapina na reatividade *in vitro* da aorta torácica de ratos.** 2022. Dissertação (Mestrado em Clínica Cirúrgica - Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto, 2022).

A esquizofrenia é uma doença mental grave e crônica relevante, que se manifesta predominantemente em indivíduos jovens até o início da idade adulta inicial. Os antipsicóticos são, sem dúvida, os principais agentes farmacoterapêuticos para tratar pessoas com esquizofrenia. Poucos medicamentos antipsicóticos se mostraram tão eficazes terapeuticamente quanto a olanzapina, mas este pode desregular o metabolismo lipídico hepático, promover a hiperlipidemia e piorar a inflamação aórtica, acelerando o desenvolvimento da aterosclerose e aumentando os riscos cardiovasculares. Assim, esse estudo foi delineado para avaliar os mecanismos envolvidos na reatividade vascular dependente do endotélio sob a ação da olanzapina uma vez que o grupo de pesquisa já apresenta resultados sobre os efeitos da clozapina na reatividade vascular. Tais drogas são bastante utilizadas e avaliadas em diversos estudos clínicos sob diferentes aspectos, mas não em relação a seu efeito direto sobre o vaso. O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos da olanzapina sobre a reatividade da aorta de rato, bem como os mecanismos envolvidos nesta resposta, e verificar se a olanzapina promove relaxamento, se é dependente ou independente do endotélio, e investigar a participação da prostaciclina, óxido nítrico e potássio na resposta vascular. Foi feito um estudo de reatividade vascular em banho de órgão isolado, e as curvas concentração-resposta para olanzapina, feitas em anéis de aorta torácica de rato pré-contraídos com fenilefrina (PE) (10^{-7} M), foram registradas na presença e na ausência dos inibidores L-Name, indometacina, ODQ, tetraetilamônio (TEA) e cloreto de potássio (KCl). A olanzapina induziu relaxamento em anéis da aorta com endotélio pré-contraído com PE, entretanto não alterou a tensão de anéis sem endotélio. Ainda em anéis de aorta com endotélio o L-Name e o ODQ, bloquearam o relaxamento induzido pela olanzapina, enquanto a indometacina não alterou esse relaxamento. A associação dos inibidores indometacina e L-Name promoveu um bloqueio completo do relaxamento induzido pela olanzapina. Tanto o TEA quanto o KCl bloquearam o relaxamento induzido pela olanzapina. Considerando os resultados encontrados no presente estudo sobre a olanzapina e os resultados

anteriormente demonstrados pelo grupo sobre a clozapina, poderíamos inferir que os antipsicóticos não seriam os responsáveis pelo aumento na ocorrência de doenças cardiovasculares em pacientes esquizofrênicos tratados, ao que diz respeito ao efeito desta classe de fármacos sobre a vasculatura. Entretanto, o perfil metabólico induzido pelos antipsicóticos não foi considerado neste estudo.

Palavras-chave: Esquizofrenia. Doenças cardiovasculares. Endotélio. Olanzapina. Reatividade vascular. Antipsicótico.

ABSTRACT

PRANDI, Marelaine. **Effects of the antipsychotic olanzapine on the *in vitro* reactivity of the rat thoracic aorta.** 2022. Dissertação (Mestrado em Clínica Cirúrgica - Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto, 2022).

Schizophrenia is a relevant serious and chronic mental illness, which manifests itself predominantly in young individuals until the beginning of early adulthood. Antipsychotics are undoubtedly the main pharmacotherapeutic agents for treating people with schizophrenia. Few antipsychotic drugs have been shown to be as therapeutically effective as olanzapine, but olanzapine can disrupt hepatic lipid metabolism, promote hyperlipidemia, and worsen aortic inflammation, accelerating the development of atherosclerosis and increasing cardiovascular risks. Thus, this study was designed to evaluate the mechanisms involved in endothelium-dependent vascular reactivity under the action of olanzapine, since the research group already presents results on the effects of clozapine on vascular reactivity. Such drugs are widely used and evaluated in several clinical studies under different aspects, but not in relation to their direct effect on the vessel. The aim of this study was to investigate the effects of olanzapine on rat aortic reactivity, as well as the mechanisms involved in this response, and to verify whether olanzapine promotes relaxation, whether it is endothelium-dependent or endothelium-independent, and to investigate the participation of prostacyclin, nitric oxide, and potassium in the vascular response. A vascular reactivity study was performed in an isolated organ bath, and concentration-response curves for olanzapine, performed on rat thoracic aorta rings pre-contracted with phenylephrine (PE) (10^{-7} M), were recorded in the presence and absence of the L-Name inhibitors, indomethacin, ODQ, tetraethylammonium (TEA) and potassium chloride (KCl). Olanzapine induced relaxation in aortic rings with endothelium pre-contracted with PE, however it did not change the tension of rings without endothelium. Still in aortic rings with endothelium, L-Name and ODQ blocked the relaxation induced by olanzapine, while indomethacin did not alter this relaxation. The association of indomethacin and L-Name inhibitors promoted a complete block of olanzapine-induced relaxation. Both TEA and KCl blocked olanzapine-induced relaxation. Considering the results found in the present study on olanzapine and the results previously demonstrated by the group on clozapine, we could infer that antipsychotics would not

be responsible for the increase in the occurrence of cardiovascular diseases in treated schizophrenic patients, regarding the effect of this class of drugs on the vasculature. However, the metabolic profile induced by antipsychotics was not considered in this study.

Keywords: Schizophrenia. Cardiovascular diseases. Endothelium. Olanzapine. Vascular reactivity. Antipsychotic.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química da olanzapina.	24
Figura 2. Vias sugeridas para explicar como os fatores relaxantes derivados do endotélio e fatores hiperpolarizante derivados do endotélio atuam.	34
Figura 3. Curva de pré-tensão realizadas com KCl (90 mM) em anéis de aorta torácica de ratos hannover.	42
Figura 4. Imagem representativa de uma curva com olanzapina em anéis de aorta isoladas com endotélio (A) e sem endotélio (B) pré contraídos com PE.	43
Figura 5. Curva dose-resposta para olanzapina em anéis de aorta de ratos, com e sem endotélio, pré-contraídos com PE (10^{-7} M).	44
Figura 6. Curva dose-resposta para olanzapina em anéis de aorta de ratos, com endotélio, pré-contraídos com PE (10^{-7} M) na ausência e presença de L-Name (10^{-4} M).	45
Figura 7. Curva dose-resposta para olanzapina em anéis de aorta de ratos, com endotélio, pré-contraídos com PE (10^{-7} M) na ausência e presença de Indometacina (10^{-5} M).	46
Figura 8. Curva dose-resposta para olanzapina em anéis de aorta de ratos, com endotélio, pré-contraídos com PE (10^{-7} M) na ausência e presença da associação de L-Name (10^{-4} M) e indometacina (10^{-5} M).....	47
Figura 9. Curva dose-resposta para olanzapina em anéis de aorta de ratos, com endotélio, pré-contraídos com PE (10^{-7} M) na ausência e presença de ODQ (10^{-2} M).	48
Figura 10. Curva dose-resposta para olanzapina em anéis de aorta de ratos, com endotélio, pré-contraídos com PE (10^{-7} M) na ausência e presença de TEA (1M). ..	49
Figura 11. Curva dose-resposta para olanzapina em anéis de aorta de ratos, com endotélio, na ausência e na presença de KCl (90 mM).	50
Figura 12. Porcentagem total de relaxamento induzido pela olanzapina em anéis de aorta de ratos, com endotélio, pré-contraídos com PE (10^{-7} M) na ausência e na	

presença dos inibidores: L-Name (10^{-4} M), indometacina (10^{-5} M), ODQ (10^{-2} M) TEA (1M) e KCl (90 mM).....51

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

AA	ácido araquidônico
ACh	Acetilcolina
ADP	Difosfato de adenosina
AMPC	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
APG	Antipsicótico de Primeira Geração
ASG	Antipsicótico de Segunda Geração
ATP	Trifosfato de adenosina
BH4	Tetrahidrobiopterina
BK	Bradicinina
BK _{Ca}	Canais para potássio ativados por cálcio de alta condutância
C ₆ H ₁₂ O ₆	Glicose
Ca ²⁺	Cálcio
[Ca ²⁺] _i	Concentração de Cálcio intracelular
CaCl	Cloreto de Cálcio
CaM	Calmodulina
CNP	peptídeo natriurético do tipo C
CO ₂	Dióxido de Carbono
COX	Ciclooxigenase
DAG	Diacilglicerol
DCV	Doença cardiovascular
EDHF	Fator hiperpolarizante derivado do endotélio
EDRF	Fator relaxante derivado do endotélio
EET	Ácido epoxieicosatrienóico
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EPM	Erro padrão da média
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
FMN	Flavina mononucleotídeo
g	Gramas
GCs	Guanilato ciclase solúvel
GMPc	Guanosina 3',5'-monofosfato cíclico
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IK _{Ca}	Canais para potássio ativados por cálcio de intermediária condutância
IP ₃	Inositol 1,4,5-trifosfato

K ⁺	Potássio
K _{ATP}	Canais para potássio dependentes de trifosfato de adenosina
K _{Ca}	Canais para potássio ativados por cálcio
KCl	Cloreto de Potássio
Kg	Quilograma
KH ₂ PO ₄	Fosfato de potássio dihidrogenado
K _{IR}	Canais para potássio de retificação interna
Kv	Canais para potássio dependentes de voltagem
L-Name	N ^G -nitro-L-arginina metil ester
M	Molar
Mg	Miligramas
MgSO ₄	Sulfato de Magnésio
ml	Mililitros
MLCK	Miosina quinase de cadeia leve
MLCP	Fosfatase da cadeia leve de miosina
mM	Milimolar
NaCl	Cloreto de Sódio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NaHCO ₃	Carbonato de Sódio
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintase
O ₂	Oxigênio
OMS	Organização Mundial da Saúde
PE	Fenilefrina
PGI ₂	Prostaciclina
PIP ₂	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
PKC	Proteína quinase C
PKG	Proteína quinase G
PLA ₂	Fosfolipase A ₂
PLC	Fosfolipase C
QT	Medida de eletrocardiograma que calcula o tempo desde o início da contração dos ventrículos cardíacos até o término do relaxamento
SERCA	Ca ²⁺ - ATPase do retículo sarcoplasmático
SK _{Ca}	Canais para potássio ativados por cálcio de baixa condutância

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	18
2. ESTADO DA ARTE	21
2.1. Esquizofrenia	21
2.2. Antipsicóticos	22
2.3. Olanzapina.....	23
2.4. Antipsicótico e doença cardiovascular.....	25
2.5. Disfunção Endotelial	27
2.6. Fatores vasodilatadores endoteliais	29
2.6.1. Cascata de formação do EDRF/NO.....	30
2.6.2. Cascata da formação da PGI ₂	31
2.6.3. Cascata de formação do EDHF	32
3. OBJETIVO.....	36
3.1. Objetivo Geral	36
3.2. Objetivos específicos	36
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
4.1. Animais	38
4.2. Delineamento experimental.....	38
4.3. Determinação da tensão basal.....	38
4.4. Estudo da reatividade vascular em câmaras de órgãos isolado (organ chambers)	39
4.5. Análise dos dados.....	40
5. RESULTADOS	42
5.1. Determinação da tensão basal utilizada nos experimentos para artéria aorta em de rato	42
5.2. Efeito da olanzapina em anéis de aorta pré-contraídos com PE	43
5.3. Participação da PGI ₂ e do NO no relaxamento induzido pela olanzapina, em anéis de aorta pré-contraídos com PE.....	45
5.4. Participação dos canais para K ⁺ no relaxamento induzido pela olanzapina, em anéis de aorta pré-contraídos com PE.....	49
6. DISCUSSÃO	53
7. CONCLUSÃO.....	58
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
9. ANEXO.....	69

1. INTRODUÇÃO

A esquizofrenia é um problema global que afeta indivíduos, famílias e sociedades e está listada entre as 20 principais causas globais de doenças, frequentemente, considerada uma doença de causa multifatorial (NASYROVA; IVASHCHENKO; IVANOV; NEZNANOV, 2015; WEI; YAN; KANG; WONG *et al.*, 2022). É um transtorno psiquiátrico debilitante e crônico, que pode resultar em incapacidade social e ocupacional (SHARMA; HUGHES; SONI; KUMARI, 2003; ZHANG; FANG; YAO; MAO *et al.*, 2017).

Embora seja bem reconhecido que os indivíduos com esse transtorno morrem prematuramente em comparação com a população em geral, (2 a 3 vezes maior chance de morte), as razões para a diferença de expectativa de vida estimada entre 15 a 20 anos não são claras, mas alguns autores citam relação com morte não natural, incluindo suicídios, acidentes, violência e abuso de substâncias. Um número considerável de pacientes morre de causas naturais, como doença cardiovascular (DCV), câncer, diabetes e doenças pulmonares (CAO; MENG; LI; MA *et al.*, 2020; CHEN; ZHANG; YAN; WANG *et al.*, 2022; CORRELL; SOLMI; CROATTO; SCHNEIDER *et al.*, 2022; GUNDUGURTI; BHATTACHARYYA; KONERU, 2022; ZHANG; HUANG; GOU; ZHOU *et al.*, 2021).

Estudos populacionais, incluindo estudos de gêmeos e familiares, indicam que a esquizofrenia é altamente hereditária e envolve a interação sinérgica de múltiplos genes e fatores ambientais (PEREZ-COSTAS; MELENDEZ-FERRO; ROBERTS, 2010). De acordo com alguns autores, tal doença, com forte componente genético, possui uma herdabilidade de aproximadamente 80 a 85% (BRENNAND; SIMONE; JOU; GELBOIN-BURKHART *et al.*, 2011; CAO; MENG; LI; MA *et al.*, 2020; GREENE; KEALY; HUMPHRIES; GONG *et al.*, 2018; ZHANG; HUANG; GOU; ZHOU *et al.*, 2021).

Esse transtorno psiquiátrico é comumente tratado com antipsicóticos, que auxilia tanto no estado psicótico agudo quanto na manutenção da doença, prevenindo recaídas. No entanto, apresentam muitos efeitos colaterais extremamente desagradáveis e onerosos em vários sentidos, como a ocorrência de dormência emocional, distúrbios do movimento e distúrbios funcionais de diversos órgãos, que podem levar ao desenvolvimento de síndrome metabólica, diabetes e DCV. (BERGE;

ABRI; ANDELL; MOVAHED *et al.*, 2022; PADERINA; BOIKO; POZHIDAEV; MEDNOVA *et al.*, 2022; SMITH; GRIFFITHS; BAND; HIRD-SMITH *et al.*, 2020).

Atualmente, os antipsicóticos são chamados de tranquilizantes típicos e atípicos (MOREIRA; GUIMARÃES, 2007b). Os típicos são classificados como primeira geração (APG) e os atípicos como segunda geração (ASG).

Nos últimos anos, os antipsicóticos mais utilizados são de ASG, como a olanzapina, que apresenta menos efeitos colaterais extrapiramidais e tem maior efeito em sintomas negativos da esquizofrenia, mas estão associados a dislipidemia, hiperglicemia e excesso de peso, que aumentam a incidência de DCV (HELIO ELKIS, 2008; RADU; LUCA; PETRESCU; BORDEJEVIC *et al.*, 2020).

Poucos medicamentos antipsicóticos se mostraram tão eficazes terapêuticamente quanto a olanzapina, mas este pode desregular o metabolismo lipídico hepático, promover a hiperlipidemia e piorar a inflamação aórtica, acelerando o desenvolvimento da aterosclerose e aumentando os riscos DCV, que são responsáveis pela maior mortalidade em pacientes com esquizofrenia (CHEN; SHYUE; HSU; LEE, 2018; LIN; PENG; HE; XU *et al.*, 2018).

Existe uma clara associação entre a utilização de drogas antipsicóticas e DCV, estudos sobre o efeito direto das drogas antipsicóticas sobre a função endotelial vascular são praticamente inexistentes (MATEUS; ALBUQUERQUE; CELOTTO; EVORA, 2019).

Assim, esse estudo foi delineado para avaliar os mecanismos envolvidos na reatividade vascular dependente do endotélio sob a ação da olanzapina uma vez que o grupo de pesquisa já apresenta resultados sobre os efeitos da clozapina na reatividade vascular. Tais drogas são bastante utilizadas e avaliadas em diversos estudos clínicos sob diferentes aspectos, mas não em relação a seu efeito direto sobre o vaso.

ESTADO DA ARTE

2. ESTADO DA ARTE

2.1. Esquizofrenia

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) 13% da população estimada, ou seja, mais de 970 milhões de pessoas são diagnosticadas com um transtorno mental. Particularmente no Brasil, 13,09% da população masculina e 15,78% da feminina são diagnosticadas com transtornos mentais (representam internações no Sistema Único de Saúde (SUS), portanto, o número pode ser subestimado, pois não contabiliza os casos sem internação) (CARTERI; OSES; CARDOSO; MOREIRA *et al.*, 2020; GREENE; KEALY; HUMPHRIES; GONG *et al.*, 2018; LIN; PENG; HE; XU *et al.*, 2018).

Devido a considerável variabilidade dos resultados de diferentes estudos epidemiológicos, provavelmente o risco de desenvolver esquizofrenia há muito estimado em cerca de 1%, não contemple o valor real. A prevalência global de esquizofrenia ajustada por idade em 2016 foi estimada em 0,28%, o que não é particularmente alto, mas esse transtorno contribui significativamente para a carga global de doenças (PADERINA; BOIKO; POZHIDAEV; MEDNOVA *et al.*, 2022).

A esquizofrenia é uma doença mental grave e crônica relevante, que se manifesta predominantemente em indivíduos jovens até o início da idade adulta inicial (NASYROVA; IVASHCHENKO; IVANOV; NEZNANOV, 2015; TIEN; EATON, 1992; TITULAER; RADHE; MAZRINA; STROM *et al.*, 2022). Em contrapartida, segundo Andrade (2015), Bleuler em 1911, em suas observações reconheceu que a esquizofrenia não acometia apenas jovens, e sim indivíduos até 54 anos de idade, e mulheres cinco anos mais tarde (ANDRADE, 2015). Os sintomas da esquizofrenia podem ser divididos em três categorias: positivos (alucinações, delírios, hostilidade e comportamento desorganizado), negativos (isolamento social, anedonia, embotamento afetivo, dificuldade em pensamento abstrato), deficiências cognitivas (atenção, aprendizado, comprometimento da memória e funcionamento executivo) e, por fim, alguns sintomas gerais (ansiedade, depressão, desorientação) (CHEN; SHYUE; HSU; LEE, 2018; CHEN; ZHANG; YAN; WANG *et al.*, 2022; FREEDMAN, 2003; LODGE; GRACE, 2011; PADERINA; BOIKO; POZHIDAEV; MEDNOVA *et al.*, 2022; SHARMA; HUGHES; SONI; KUMARI, 2003; ZHANG; FANG; YAO; MAO *et al.*, 2017).

O sistema dopaminérgico é o sistema neurotransmissor que tem sido mais comumente associado à esquizofrenia (CHEN; SHYUE; HSU; LEE, 2018; LODGE; GRACE, 2011). Assim, os medicamentos antipsicóticos são antagonistas do receptor D2 da dopamina. Os antipsicóticos típicos, APG, atenuam efetivamente os sintomas positivos da esquizofrenia, bloqueando os receptores D2 da dopamina nos neurônios pós-sinápticos. No entanto, devido à sua alta afinidade pelos receptores de dopamina D2, os APG estão associados a um alto risco de efeitos adversos motores extrapiramidais (CHEN; SHYUE; HSU; LEE, 2018; FIELD; WALKER; CONN, 2011; LODGE; GRACE, 2011).

2.2. Antipsicóticos

Os antipsicóticos são, sem dúvida, os principais agentes farmacoterapêuticos para tratar pessoas com esquizofrenia, tanto no estado psicótico agudo quanto na manutenção da doença para prevenir recaídas. Especialmente em doses mais baixas, ficaram populares no tratamento de muitos distúrbios psiquiátricos e comportamentais, incluindo ansiedade, insônia e agitação (BERGE; ABRI; ANDELL; MOVAHED *et al.*, 2022; PADERINA; BOIKO; POZHIDAEV; MEDNOVA *et al.*, 2022). No entanto, eles também têm efeitos colaterais extremamente desagradáveis e onerosos em vários domínios do funcionamento humano. Dentre outros efeitos, também são conhecidos por prejudicar o metabolismo da glicose, aumentar os níveis de colesterol e triglicerídeos e causar hipertensão arterial, levando à síndrome metabólica e maior risco de diabetes e DCV (PADERINA; BOIKO; POZHIDAEV; MEDNOVA *et al.*, 2022; SMITH; GRIFFITHS; BAND; HIRD-SMITH *et al.*, 2020).

Embora a ciência tenha se dedicado em pesquisas com medicamentos antipsicóticos para a esquizofrenia, as respostas clínicas ainda são insatisfatórias, pois alguns pacientes (15% - 30%) não respondem tão bem ao tratamento e ainda são encontrados casos que são refratários ao tratamento.

Os medicamentos antipsicóticos eram denominados como neurolépticos (tranquilizantes maiores) em oposição aos benzodiazepínicos (tranquilizantes menores). Atualmente, os neurolépticos são chamados de tranquilizantes típicos e atípicos (MOREIRA; GUIMARÃES, 2007a).

Os ASG são os medicamentos mais utilizados no tratamento de pacientes com esquizofrenia nos últimos anos. Apesar dos efeitos positivos no tratamento da doença,

estão associados a dislipidemia, hiperglicemia e excesso de peso, que aumentam a incidência de DCV. A ocorrência de inflamação e disfunção endotelial promovem aterosclerose, além de outras DCV (HELIO ELKIS, 2008; RADU; LUCA; PETRESCU; BORDEJEVIC *et al.*, 2020). Dados meta-analíticos recentes sugerem ainda que os ASG podem causar resistência à insulina, ganho de peso e hiperlipidemia em indivíduos saudáveis em até duas semanas ou menos (BERGE; ABRI; ANDELL; MOVAHED *et al.*, 2022; BOIKO; MEDNOVA; KORNETOVA; GERASIMOVA *et al.*, 2021; CHEN; SHYUE; HSU; LEE, 2018; LIN; PENG; HE; XU *et al.*, 2018).

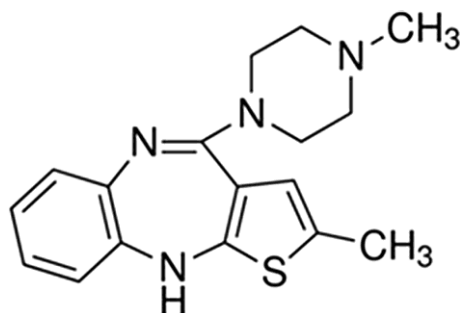
2.3. Olanzapina

A olanzapina, ASG, surgiu em 1996 como antipsicótico atípico comumente utilizado no tratamento da esquizofrenia e transtornos bipolares (BERGE; ABRI; ANDELL; MOVAHED *et al.*, 2022; DIJKSTRA; VAN DER WEIDEN; SCHOL-GELOK; MULLER-HANSMA *et al.*, 2018; LIN; PENG; HE; XU *et al.*, 2018; SHAH; SUBHAN; ALI; ULLAH *et al.*, 2016). Foi originalmente descoberta e desenvolvida em Erl Wood, no Lilly Research Center em Surey, Inglaterra. O projeto foi baseado na premissa de que era possível desenvolver um medicamento antipsicótico seguro tão eficaz quanto todos os antipsicóticos existentes, mas também que tratasse os sintomas negativos e tivesse um melhor perfil de efeitos adversos do que os compostos existentes (BYMASTER; RASMUSSEN; CALLIGARO; NELSON *et al.*, 1997; GULAC; ARNOLD; GRMAN; CARREL *et al.*, 2020).

Alguns dos nomes comerciais da olanzapina são: *Axonium*, *Midax*, *Zyprexa*, *Zydis*, *Zap*, *Zalasta*, *Zolafren*, *Olzapin*, *Rexapin* e *Simbiac* (combinado com fluoxetina).

A estrutura química da olanzapina é composta por 2-metil-4-(4-metil-1-piperazinil) -10H-tieno [2,3-b] [1,5] benzodiazepina (Figura 1), com fórmula molecular $C_{17}H_{20}N_4S$ e tem um peso molecular de 312,44 (RÊGO; DE MOURA; MOITA, 2010), 2010).

Figura 1. Estrutura química da olanzapina.



Fonte: Radioprotective effect of olanzapine as an anti-psychotic drug against genotoxicity and apoptosis induced by ionizing radiation on human lymphocytes - Scientific Figure on ResearchGate. Available from: https://www.researchgate.net/figure/Chemical-structure-of-olanzapine_fig1_335133616 [accessed 26 Julho, 2022].

Apesar dos incrementos em relação ao tratamento da esquizofrenia, diversos efeitos adversos também foram relatados depois do uso da olanzapina, como distúrbios cardiometabólicos (obesidade, diabetes mellitus, hiperglicemia, hipertensão e anormalidades lipídicas), taxas mais altas de arritmias, aumento da glicemia, hiperlipidemia, níveis circulantes mais baixos de ácidos graxos livres, sonolência, hiperprolactinemia, sequelas metabólicas deletérias, em alguns casos ocasionam galactorréia e ginecomastia (BERGE; ABRI; ANDELL; MOVAHED *et al.*, 2022; CARPENE; LES; MERCADER; GOMEZ-ZORITA *et al.*, 2020; DI LORENZO; BROGLI, 2010; DIJKSTRA; VAN DER WEIDEN; SCHOL-GELOK; MULLER-HANSMA *et al.*, 2018; KOMOSSA; RUMMEL-KLUGE; HUNGER; SCHMID *et al.*, 2010; LAZZARI; SERRA; MARCELLO; PIRA *et al.*, 2017; LIN; PENG; HE; XU *et al.*, 2018). Alguns efeitos adversos dos antipsicóticos, como tontura, hipotensão ortostática e efeitos anticolinérgicos acontecem com menor frequência (DE-OLIVEIRA; DA-SILVA; RAMIS; FERREIRA *et al.*, 2018; MAHER; CUNNINGHAM; O'CALLAGHAN; BYRNE *et al.*, 2016).

Patrik Gulac e colaboradores (2020), relata que a incidência de morte súbita cardíaca em pacientes tratados com olanzapina é duas vezes maior do que em não usuários, mas o mecanismo subjacente aos efeitos cardíacos adversos graves permanece pouco compreendido (BEAUCHEMIN; GEGUCHADZE; GUNTUR; NEVOLA *et al.*, 2020; GULAC; ARNOLD; GRMAN; CARREL *et al.*, 2020).

Em uma meta-análise, Rong Li e colaboradores (2020) investigaram os efeitos do tratamento com olanzapina nos perfis lipídicos de pacientes com esquizofrenia e encontrou níveis elevados de triglicérides, colesterol total e LDL-Colesterol após 4 semanas de tratamento (LI; ZHANG; ZHU; DING *et al.*, 2020).

Os antipsicóticos atípicos como a olanzapina derivados da tienobenzodiazepina tem afinidades com vários receptores, como os receptores dopaminérgico (D1-D4), serotoninérgico (5-HT1, 5-HT2, e 5-HT6), muscarínicos (subtipos 1-5), adrenérgico Alfa 1 e 2 e histaminérgico (H1) (BYMASTER; RASMUSSEN; CALLIGARO; NELSON *et al.*, 1997; LAZZARI; SERRA; MARCELLO; PIRA *et al.*, 2017; SHARMA; HUGHES; SONI; KUMARI, 2003). Uma menor afinidade pelo receptor alfa2-adrenérgico pode resultar na redução de efeitos colaterais cardiovasculares comparados a clozapina (BYMASTER; RASMUSSEN; CALLIGARO; NELSON *et al.*, 1997).

Muitas hipóteses sobre os distúrbios metabólicos induzidos pela olanzapina foram levantadas, incluindo diferentes receptores, como histamina H1, serotonina 5-HT2C, 5-HT2A, dopamina D2, muscarínicos M2, M3 e receptores adrenérgicos, mas o mecanismo pelo qual esse antipsicótico causa problemas metabólicos não foi adequadamente explicado, de modo que a previsão e a prevenção ainda permanecem inatingíveis (LIN; PENG; HE; XU *et al.*, 2018; NASRALLAH, 2008).

2.4. Antipsicótico e doença cardiovascular

Desde o início da década de 60 a associação entre antipsicótico e morte súbita cardíaca tem sido relatada. Existe um risco elevado de doença cardiometabólica entre pacientes com esquizofrenia. As taxas de prevalência de DCV e a mortalidade associada são muito mais altas entre pacientes com esquizofrenia do que entre a população em geral (BEAUCHEMIN; GEGUCHADZE; GUNTUR; NEVOLA *et al.*, 2020; CAO; MENG; LI; MA *et al.*, 2020; GUNDUGURTI; BHATTACHARYYA; KONERU, 2022; HENNEKENS; HENNEKENS; HOLLAR; CASEY, 2005; O'GALLAGHER; TEO; SHAH; GAUGHRAN, 2022; SMITH; GRIFFITHS; BAND; HIRD-SMITH *et al.*, 2020).

Por outro lado, há evidências crescentes que apoiam o efeito protetor do tratamento com antipsicótico ao contrário do não uso do medicamento. Brander e colaboradores (2019) sugeriram que o tratamento com antipsicóticos pode reduzir o

risco de distúrbios cardiometabólicos entre aqueles com transtornos de tiques crônicos (BRANDER; ISOMURA; CHANG; KUJA-HALKOLA *et al.*, 2019). No estudo de Taipale e colaboradores (2020), a exposição a olanzapina ou quetiapina foram significativamente associadas à menor mortalidade cardiovascular (TAIPALE; TANSKANEN; MEHTALA; VATTULAINEN *et al.*, 2020). Para Correll e colaboradores (2022) o uso de antipsicóticos versus o não uso foi associado a um risco significativamente diminuído de morte por doença cardiovascular em indivíduos com esquizofrenia (CORRELL; SOLMI; CROATTO; SCHNEIDER *et al.*, 2022).

Esse aparente paradoxo foi explicado por comportamentos de estilo de vida mais saudáveis, menos estresse, aumento de cortisol relacionado à psicose e melhores comportamentos de busca de ajuda em indivíduos tratados com antipsicóticos. Até mesmo a adesão ao tratamento foi associada à diminuição do risco de descontinuação de antidiabéticos, estatinas, anti-hipertensivos e betabloqueadores em análises intraindivíduo (SOLMI; TIIHONEN; LAHTEENVUO; TANSKANEN *et al.*, 2022).

A exposição prolongada a antipsicóticos pode danificar diretamente o músculo cardíaco levando a um comprometimento irreversível, principalmente pelo prolongamento do intervalo QT, bloqueando o canal de potássio, que por sua vez resulta em arritmias ventriculares com risco de vida (CHEN; ZHANG; YAN; WANG *et al.*, 2022).

Um estudo de Chen e colaboradores (2018) conduzido com a olanzapina apresentou esse antipsicótico como responsável pela alteração do metabolismo lipídico hepático, aumento da hiperlipidemia e inflamação aórtica, que agrava a aterosclerose (CHEN; SHYUE; HSU; LEE, 2018). E Lina e colaboradores (2018) sugerem alguns biomarcadores que podem indicar a patogênese da esquizofrenia e participar do desenvolvimento de efeitos metabólicos adversos induzidos pela olanzapina (LIN; PENG; HE; XU *et al.*, 2018).

Estudos experimentais e clínicos no campo da biologia vascular, indicam que as disfunções endoteliais estão associadas a DCV, em muitas situações. O endotélio tem uma grande importância na modulação do tônus vascular, por produzir fatores relaxantes derivados do endotélio (EDRF), como prostaglandinas, óxido nítrico (NO) e fatores de hiperpolarização derivados do endotélio (EDHF). A redução da produção de EDRF, pode levar a uma disfunção endotelial causando DCV (LERTKIATMONGKOL; LIAO; MEI; HU *et al.*, 2016).

Vários fatores de risco cardiovascular, como hipertensão arterial sistêmica, diabetes mellitus, obesidade e tabagismo, podem influenciar a disfunção endotelial que é associada à perda da vasodilatação dependente do endotélio (DE MELO, 2014).

2.5. Disfunção Endotelial

O endotélio é fundamental para a biologia vascular, e por suas inúmeras funções, poderia ser considerado um órgão completo. Consiste em uma única camada de células que cobre a superfície interna dos vasos sanguíneos ao longo de toda a vasculatura na interface do sangue circulante e da parede do vaso. Composto por cerca de 10^{13} células, representando 1,5 kg, o endotélio tem papel fundamental em diversos processos fisiológicos como manutenção da homeostase microvascular, regulação do tônus vascular, hemostasia primária, tráfego celular e a inflamação no sistema circulatório (BURGHARDT; GROVE; ELLINGROD, 2014; ELLINGROD; GROVE; BURGHARDT; TAYLOR *et al.*, 2015; RAIÁ; ZAFRANI, 2022; VETTER; MARTIN; FUNG; PAJEVIC *et al.*, 2015).

Os ataques repetidos ao endotélio vascular resultam em uma resposta inflamatória e disfunção endotelial, que é caracterizada pelo desequilíbrio na produção dos mediadores que regulam o tônus vascular, agregação plaquetária, coagulação e fibrinólise (BURGHARDT; GROVE; ELLINGROD, 2014; DE-OLIVEIRA; DA-SILVA; RAMIS; FERREIRA *et al.*, 2018).

A perda da biodisponibilidade do NO e a secreção anormal de outras substâncias vasoativas derivadas do endotélio, somados ao estilo de vida, dieta e medicamentos, contribuem para a disfunção endotelial (BURGHARDT; GROVE; ELLINGROD, 2014; DE-OLIVEIRA; DA-SILVA; RAMIS; FERREIRA *et al.*, 2018).

Alguns estudos sugerem que a esquizofrenia está associada a um estado pró-inflamatório crônico e aumento do dano celular induzido pelo estresse oxidativo, o que pode levar à disfunção endotelial (BURGHARDT; GROVE; ELLINGROD, 2014; MARUHASHI; IWAMOTO; KAJIKAWA; ODA *et al.*, 2017; NGUYEN; DEV; CHEN; LIOU *et al.*, 2018; RADU; LUCA; PETRESCU; BORDEJEVIC *et al.*, 2020; WACLAWOVSKY; DE BRITO; SMITH; VANCAMPFORT *et al.*, 2021). Estudo de Nguyen e colaboradores (2018) sugere que reduzindo a inflamação e o risco vascular poderia auxiliar na redução das anormalidades vasculares, prevenindo a morbidade e

mortalidade cardiovascular, bem como, a disfunção cognitiva na esquizofrenia (NGUYEN; DEV; CHEN; LIOU *et al.*, 2018).

A disfunção endotelial é provavelmente uma parte do quadro exibido pela maioria dos indivíduos com esquizofrenia. O tratamento com os antipsicóticos atípicos aumenta o risco de síndrome metabólica e DCV que, por sua vez, está associada a um estado pró-inflamatório e a um potencial aumento da disfunção endotelial, em função dos fatores pró-inflamatórios que interferem na produção de NO nesse estado (BURGHARDT; GROVE; ELLINGROD, 2014; DE-OLIVEIRA; DA-SILVA; RAMIS; FERREIRA *et al.*, 2018; WACLAWOVSKY; DE BRITO; SMITH; VANCAMPFORT *et al.*, 2021).

O NO foi originalmente identificado como EDRF mediando o relaxamento dos vasos sanguíneos (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980). O NO desempenha papéis essenciais na regulação de uma ampla gama de processos fisiológicos, incluindo imunidade celular, tônus vascular e neurotransmissão (PITSIKAS, 2015; RAIA; ZAFRANI, 2022).

Várias linhas de pesquisa sugerem a implicação do NO na esquizofrenia, pois é um importante mensageiro que atua nas vias dopaminérgica e serotoninérgica, assim é sugerido que o funcionamento anormal dessas vias estaria envolvido na fisiopatologia da doença. Tanto o excesso quanto os baixos níveis de NO estão ligados a essa patologia, embora a direção das anormalidades ainda esteja em debate (CATAK; KAYA; KOCDEMIR; UGUR *et al.*, 2020; PITSIKAS, 2015; TAO; MIAO; LI; YUAN *et al.*, 2020; ZOROGLU; HERKEN; YUREKLI; UZ *et al.*, 2002; ZOUPA; PITSIKAS, 2021).

Zoroglu e colaboradores (2002) examinaram os níveis plasmáticos de nitrito (um metabólito do NO) e adrenomedulina (AM) em pacientes esquizofrênicos e concluíram que tanto o NO quanto o AM podem ter um papel fisiopatológico na esquizofrenia, e clinicamente na sintomatologia e no prognóstico da doença (ZOROGLU; HERKEN; YUREKLI; UZ *et al.*, 2002). No entanto, Catak e colaboradores (2020) relataram que a partir da avaliação dos níveis sanguíneos de NO de pacientes com esquizofrenia, nenhum consenso foi estabelecido, com alguns estudos sugerindo níveis mais baixos, enquanto outros encontraram níveis mais altos (CATAK; KAYA; KOCDEMIR; UGUR *et al.*, 2020). Já Pitsikas, (2015) comenta que achados da literatura consideram que baixas concentrações de NO podem conferir neuroproteção e regular a sinalização fisiológica, como neurotransmissão ou vasorelaxamento,

enquanto altos níveis de NO promovem efeitos imunológicos/inflamatórios que são neurotóxicos (PITSIKAS, 2015).

Em resumo, a esquizofrenia é caracterizada por um perfil anormal de biomarcadores endoteliais vasculares, e o grau de anormalidade está relacionado ao aumento da resposta inflamatória e piora da saúde vascular, ampliados pelo uso de antipsicóticos atípicos que implicam no desenvolvimento de síndrome metabólica e em consequência as DCV (CHEN; SHYUE; HSU; LEE, 2018; NGUYEN; DEV; CHEN; LIOU *et al.*, 2018).

2.6. Fatores vasodilatadores endoteliais

Em 1976, Moncada e colaboradores, estudando o metabolismo do ácido araquidônico em parede vascular, descobriram a prostaciclina (PGI₂), um potente vasodilatador sintetizado preferencialmente pelo endotélio (MONCADA; GRYGLEWSKI; BUNTING; VANE, 1976). Em 1980, Furchgott e Zawadzki 1980, mostraram que o relaxamento vascular induzido por acetilcolina (ACh) era dependente do endotélio, o qual liberava uma substância, diferente da PGI₂. Esta substância, naquela época desconhecida e posteriormente chamada de EDRF, desencadeou uma verdadeira corrida em busca de sua identidade. E embora esta corrida tenha terminado em 1987, quando Palmer, Ferrige e Moncada 1987 revelaram o NO como sendo o EDRF, um ano antes Furchgott e Ignarro em trabalhos independentes, haviam sugerido que o EDRF era o NO ou um composto relacionado (IGNARRO; BUGA; WOOD; BYRNS *et al.*, 1987; PALMER; FERRIGE; MONCADA, 1987). Três décadas após a descoberta da vital importância do endotélio para o controle do tônus vascular, o NO e a PGI₂ continuam sendo considerados os principais EDRF. Entretanto, o fato destes EDRF não responderem por 100% do relaxamento vascular induzido por agonista sugeriu a existência de um outro fator, denominado EDHF (LUKSHA; AGEWALL; KUBLICKIENE, 2009). Essa vital importância do endotélio relaciona-se com sua posição anatômica. Estrategicamente localizado entre o sangue circulante e a parede dos vasos, o endotélio pode responder às alterações nas forças hemodinâmicas, nas concentrações de mediadores e no pH, liberando seus fatores, os quais controlam o tônus vascular e, desta maneira, adequam o fluxo sanguíneo e a pressão arterial às necessidades do organismo

(CELOTTO; CAPELLINI; BALDO; DALIO *et al.*, 2008; CHIEN; LI; SHYY, 1998; WAJCHENBERG, 2002).

2.6.1. Cascata de formação do EDRF/NO

A via clássica de produção de NO (Figura 2) pelo endotélio envolve a ligação de agonistas em receptores acoplados à proteína Gq que, por sua vez, ativa a fosfolipase C (PLC). A PLC age sobre o fosfolípide de membrana fosfatidinositol 4,5-bifosfato (PIP₂) clivando-o em diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃). O DAG permanece na membrana citoplasmática e ativa a proteína quinase C (PKC), a qual controla muitas funções celulares através da fosforilação de uma variedade de proteínas. O IP₃ difunde-se para o citosol e liga-se ao seu receptor na membrana do retículo endoplasmático promovendo saída de cálcio (Ca²⁺) do retículo, o que resulta em aumento na concentração citoplasmática de Ca²⁺ (Rang,2004). Este evento é necessário para a ativação da sintase do óxido nítrico endotelial (eNOS), a qual, na presença do complexo cálcio-calmodulina (Ca²⁺-CaM) e de cofatores como nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), tetrahidrobiopterina (BH₄), flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e flavina mononucleotídeo (FMN), converte L-arginina em NO e L-citrulina (MAXWELL, 2002; RANG; RITTER; FLOWER; HENDERSON, 2016).

Após sua síntese, o NO se difunde para as células musculares lisas vasculares onde se liga ao grupo-heme da guanilato ciclase solúvel (GCs), ativando-a. A ativação da GCs aumenta a formação de guanosina 3',5'-monofosfato cíclico (GMPc) (MAXWELL, 2002; WALFORD; LOSCALZO, 2003), que bloqueia os canais para Ca²⁺ dependentes de voltagem presentes na membrana celular e ativa a PKG dependente de GMPc. A PKG fosforila proteínas do retículo, dentre elas a phospholamban, responsável pela ativação da ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA) que sequestra Ca²⁺ para dentro do retículo sarcoplasmático (WALFORD; LOSCALZO, 2003). A PKG também inibe a RhoA quinase, enzima responsável pela ativação da quinase da cadeia leve da miosina (MLCK) e inativação da fosfatase da cadeia leve da miosina (MLCP) (BRUCKDORFER, 2005). Desta forma, ocorre redução na concentração intracelular de Ca²⁺ ([Ca²⁺]_i) e inibição da fosforilação da miosina acarretando relaxamento (BRUCKDORFER, 2005; MORGADO; CAIRRAO; SANTOS-SILVA; VERDE, 2012a; WALFORD; LOSCALZO, 2003). Apesar de estes serem importantes mecanismos pelos quais o NO desencadeia relaxamento, eles não

são os únicos. A PKG, dentre muitas outras ações, fosforila também os canais para potássio (K^+) ativados por Ca^{2+} de alta condutância (BK_{Ca}), aumentando o efluxo de K^+ , e o receptor de IP_3 , impedindo a liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares (BRUCKDORFER, 2005; MORGADO; CAIRRAO; SANTOS-SILVA; VERDE, 2012a). Ademais, O NO também pode ativar diretamente os canais BK_{Ca} (BRUCKDORFER, 2005; HATTORI, 2002; MORGADO; CAIRRAO; SANTOS-SILVA; VERDE, 2012a).

2.6.2. Cascata da formação da PGI₂

A prostaciclina (PGI_2), o principal prostanóide endotelial, tem sua síntese desencadeada por diferentes estímulos (Figura 2). O ácido araquidônico (AA), seu precursor, pode ser liberado da membrana citoplasmática pela ação da fosfolipase A2 (PLA2) ou pode ser oriundo da ativação da PLC. A ligação de vários agonistas, incluindo acetilcolina ACh, bradicinina (BK), histamina, trifosfato de adenosina (ATP) e difosfato de adenosina (ADP), aos seus respectivos receptores ativa a PLC, com consequente liberação de DAG, o qual, após hidrólise, origina o AA. O AA é então metabolizado pela ciclooxigenase (COX), originando a PGI_2 , a qual é liberada da célula endotelial imediatamente após sua síntese (DE NUCCI; GRYGLEWSKI; WARNER; VANE, 1988; GRYGLEWSKI, 2008). Nas células musculares lisas, a PGI_2 exerce seus efeitos biológicos via ligação com um receptor de membrana específico, denominado IP. Este receptor está acoplado à adenilato ciclase via proteína Gs, de modo que sua ligação com a PGI_2 resulta na ativação desta ciclase, com consequente aumento dos níveis intracelulares de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPc). O AMPc ativa a proteína quinase dependente de AMPc (PKA), a qual, assim como a PKG, fosforila diversas proteínas regulando suas atividades e, desta forma, reduz a $[Ca^{2+}]_i$; promovendo relaxamento (NARUMIYA; SUGIMOTO; USHIKUBI, 1999; ORIE; CLAPP, 2011). Dentre as principais fosforilações mediadas pela PKA estão a da phospholamban e dos canais para Ca^{2+} dependentes de voltagem (MORGADO; CAIRRAO; SANTOS-SILVA; VERDE, 2012a). Além disso, a via AMPc/PKA pode ativar os canais para K^+ dependentes de voltagem (K_v), os BK_{Ca} , os canais para K^+ dependentes de ATP (K_{ATP}) e os canais para K^+ de retificação interna (KIR), culminando em relaxamento por hiperpolarização (KO; HAN; JUNG; PARK, 2008; MORGADO; CAIRRAO; SANTOS-SILVA; VERDE, 2012a). Também já foi demonstrado que a PGI_2 pode desencadear relaxamento por mecanismos independentes de AMPc, os quais envolvem o acoplamento do receptor IP ao BK_{Ca}

via proteína Gs (TANAKA; KOIKE; TORO, 2004). Além de cada uma destas vias, NO-GMPc e PGI₂-AMPc, desencadear relaxamento por si só, existe um intenso crosstalk entre estas duas vias. Entenda-se por crosstalk a capacidade de alguns componentes da transdução de sinal de uma via de influenciar os componentes da outra via (PELLIGRINO; WANG, 1998). Dentre alguns exemplos de crosstalk podem ser citados: a transdução de um sinal, mediado por receptor, que resulte na ativação da PLC pode levar tanto a síntese de NO quanto de PGI₂ (de Nucci, 1988); a inibição, mediada pelo GMPc, da fosfodiesterase III (PDE III), enzima responsável pela degradação do AMPc (BRUCKDORFER, 2005; PELLIGRINO; WANG, 1998; WALFORD; LOSCALZO, 2003) a inibição, mediada pela PKA, da fosfodiesterase I (PDE I), que hidrolisa preferencialmente GMPc; e a ativação da ambas proteínas quinase, PKA e PKG, por AMPc (PELLIGRINO; WANG, 1998).

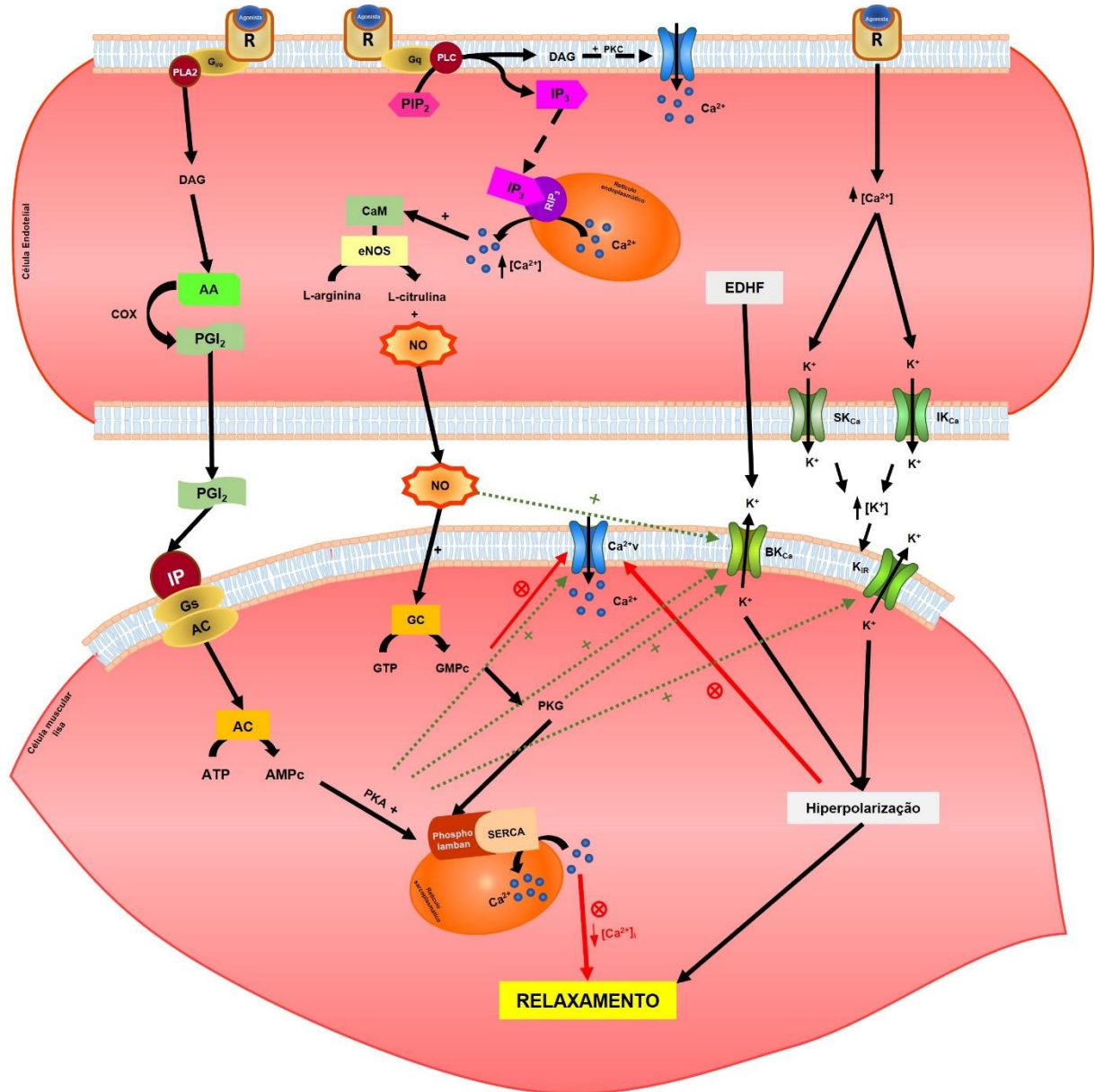
2.6.3. Cascata de formação do EDHF

O EDHF, cuja identidade ainda não é completamente conhecida, pode ser definido como um processo, dependente do endotélio, independente do NO e da PGI₂, que promove relaxamento por hiperpolarização do músculo liso e envolve a ativação de canais para K⁺, principalmente os canais para K⁺ ativados por Ca²⁺ (K_{Ca}) (Figura 2) (CAMPBELL; FLEMING, 2010; GOLDING; MARRELLI; YOU; BRYAN, 2002). Duas vias gerais são sugeridas para explicar os mecanismos pelos quais o EDHF atua. A via dos fatores difusíveis, que são substâncias derivadas do endotélio capazes de atravessar a lâmina interna e atingir as células musculares lisas vasculares subjacentes, é representada pelos íons K⁺, metabólitos do AA, principalmente o ácido eposíeicosatrienóico (EET), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e peptídeo natriurético do tipo C (CNP). A outra via, mediada por mecanismos de contato, permite que a hiperpolarização das células endoteliais se espalhe passivamente, como um evento puramente elétrico, para as células musculares lisas vasculares através das junções mioendoteliais. Estas vias não são exclusivas, podendo coexistir (BRYAN; YOU; GOLDING; MARRELLI, 2005; FITZGERALD; KEMP-HARPER; TARE; PARKINGTON, 2005; LUKSHA; AGEWALL; KUBLICKIENE, 2009). Embora haja muita controvérsia em relação ao mecanismo pelo qual o EDHF promove relaxamento, acredita-se que a ligação de agonistas a receptores endoteliais, promovendo aumento na [Ca²⁺]_i, seja o evento inicial responsável pela ativação de K_{Ca}, síntese de substâncias difusíveis e/ou geração de sinais capazes de

se difundir através das junções mioendoteliais. A ativação dos canais para K^+ ativados por Ca^{2+} de intermediária (IK_{Ca}) e baixa condutância (SK_{Ca}) promove o efluxo de K^+ e a consequente hiperpolarização das células endoteliais. A hiperpolarização das células endoteliais, via mecanismos de contato, reduz o potencial de membrana das células musculares lisas. Além disso, o aumento na concentração extracelular de K^+ ativa a bomba Na^+/K^+ ATPase e os K_{IR} , o que também resulta em hiperpolarização da musculatura lisa. Ademais, substâncias difusíveis, como o EET e o H_2O_2 , alcançam as células musculares lisas, onde ativam os BK_{Ca} , desencadeando hiperpolarização. Desta maneira, a hiperpolarização das células musculares lisas vasculares desencadeia o fechamento dos canais para Ca^{2+} dependentes de voltagem, resultando em relaxamento. Acrescente-se a todos estes mecanismos hiperpolarizantes o fato de as junções mioendoteliais, além de servirem como um canal para a transdução do sinal elétrico, facilitarem a passagem do EDHF difusível do endotélio para o músculo liso vascular (BRYAN; YOU; GOLDING; MARRELLI, 2005; FELETOU; VANHOUTTE, 2009; LUKSHA; AGEWALL; KUBLICKIENE, 2009).

Finalmente, ressalte-se o fato de que todas as tentativas de identificar um EDHF foram frustrantes. O conceito mais aceito é que a hiperpolarização é um efeito induzido e não o efeito causado por algum fator endotelial. Assim, a hiperpolarização poderia ser induzida pelos próprios EDRF (NO e PGI₂).

Figura 2. Vias sugeridas para explicar como os fatores relaxantes derivados do endotélio e fatores hiperpolarizante derivados do endotélio atuam.



Fonte: Próprio autor.

3. OBJETIVO

3.1. Objetivo Geral

Investigar os efeitos da olanzapina sobre a reatividade da aorta de rato, bem como os mecanismos envolvidos nesta resposta.

3.2. Objetivos específicos

- Verificar se a olanzapina promove relaxamento e se este é dependente ou independente do endotélio.
- Investigar a participação da PGI₂, do NO e do K⁺ na resposta vascular induzida pela olanzapina.

MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais

Foram utilizados ratos Hannover machos, com idade média de 70-90 dias (250 a 300 g), provenientes do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP). Os animais foram acondicionados em ambiente com temperatura (22 - 25°C) e ciclo claro/escuro (12/12 horas) controlados. Os animais tiveram livre acesso à água e à ração. Os procedimentos com os animais, bem como os protocolos experimentais deste estudo, foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (CEUA-FMRP), sob número de protocolo 048/2020.

4.2. Delineamento experimental

Os animais foram anestesiados com uretana (40 mg/kg, intraperitoneal). Após completa anestesia, foi realizada uma incisão abdominal seguida de exsanguinação pela aorta abdominal. Em seguida, foi realizada toracotomia para retirada da aorta torácica. Imediatamente após a coleta, a aorta foi imersa em solução de Krebs para a realização dos protocolos de reatividade vascular.

4.3. Determinação da tensão basal

Com o objetivo de determinar a tensão basal ideal a ser utilizada nos protocolos experimentais foram realizadas curvas de tensão crescentes (0,5 a 2,0), estimulado com KCL 90 mM em anéis de aorta torácica de ratos hannover.

As preparações permaneceram em equilíbrio durante 30 minutos. Em solução fisiológica de Krebs, sob a tensão 0,5g. Em seguida, os anéis foram estimulados com KCL 90 mM. Após a estabilização da resposta contrátil, as preparações foram lavadas continuamente com solução fisiológica de Krebs durante 15 minutos. Outra tensão foi aplicada (1,0g) e as preparações permaneceram em equilíbrio por 30 min. Foi adicionado KCL 90 mM e os procedimentos citados acima foram repetidos sucessivamente com as demais tensões que foram aplicadas (1,25; 1,5; 2,0 g).

Chegamos à conclusão de que o ideal para a tensão da aorta de ratos hannover é de 1,0 g.

4.4. Estudo da reatividade vascular em câmaras de órgãos isolado (organ chambers)

A aorta torácica, mantida em solução de Krebs (composição em mM: NaCl 118,3; KCl 4,7; MgSO₄ 1,2; KH₂PO₄ 1,22; CaCl₂ 2,5; NaHCO₃ 25,0 e C₆H₁₂O₆ 11,1; pH 7,4), foi dissecada para remoção de tecidos externos à adventícia e seccionada em anéis de 4 mm de extensão. O endotélio de alguns anéis foi removido, mecânica e delicadamente, com auxílio de uma pequena pinça.

Após esta preparação inicial, cada anel foi suspenso entre duas alças de aço inoxidável, que foram passadas através de sua luz, e este conjunto foi imerso em uma cuba (10 ml) do sistema de banho de órgãos. As cubas foram preenchidas com solução de Krebs, mantidas a 37°C e aeradas com mistura carbogênica (95% O₂ e 5% CO₂). Uma das alças foi ancorada a um suporte fixo e a outra foi conectada a um transdutor (Grass force-displacement transducer FT03, Grass Instrument CO, Quincy, Massachusetts, EUA) para mensuração da tensão isométrica. Os transdutores foram acoplados a um registrador de 8 canais (Gould, Cleveland, Ohio, EUA), permitindo, desta forma, o registro simultâneo da tensão isométrica de até 8 anéis vasculares.

Antes de iniciar os experimentos farmacológicos propriamente ditos, os anéis vasculares foram submetidos ao ponto ótimo de estiramento-tensão de 1,0 g, por meio de um sistema micrométrico, e permaneceram em repouso sob esta tensão durante 60 minutos. Após este período de estabilização, a viabilidade da preparação foi testada com fenilefrina (PE) (10⁻⁷ M) e a integridade do endotélio foi verificada com a administração de acetilcolina (ACh) (10⁻⁶ M) em anéis pré-contraídos com PE.

Desta forma, foram considerados “com endotélio” os anéis vasculares, não submetidos à remoção mecânica do endotélio, que relaxaram e reduziram pelo menos em 80% a sua contração. Em contrapartida, aqueles anéis vasculares, não submetidos à remoção mecânica do endotélio, que relaxaram menos de 80%, foram descartados.

Por fim, foram considerados “sem endotélio” os anéis vasculares, submetidos à remoção mecânica do endotélio, que não relaxaram em resposta à ACh. Subsequentemente, a solução das cubas foi substituída por uma solução de Krebs

pura e a preparação foi deixada em repouso por 1h. Após essa uma 1h de estabilização, os anéis, com e sem endotélio, foram pré-contraídos com PE, concentração do fármaco que produz 80% do efeito máximo ou EC80 e, após o alcance de um platô estável, curvas dose-resposta para a droga antipsicótica (olanzapina) na faixa de 10^{-10} M a 10^{-6} M, foram obtidas.

As curvas dose-resposta em anéis pré-contraídos com PE, foram realizadas na presença e na ausência de inibidores, os quais foram incubados, isolados e/ou em associação, por 30 minutos.

Para verificar a participação dos produtos do ácido araquidônico foi utilizada a indometacina (10^{-5} M), que é um inibidor não seletivo da COX. Com o objetivo de avaliar a participação do NO, as curvas foram realizadas na presença de N^G-nitro-L-arginina metil éster (L-Name) (10^{-4} M)), um inibidor inespecífico do óxido nítrico sintase (NOS) e ODQ (10^{-5} M) um inibidor seletivo da Guanilato ciclase. Para estudar a participação dos canais de potássio (K⁺) utilizamos o Tetraetilamônio (TEA) (10^{-6} M) como um bloqueador não seletivo do canal de potássio, e pré-contracção com KCl (10^{-6} M).

4.5. Análise dos dados

Os dados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM) e foram comparados pela análise de variância da via (two-way ANOVA), seguida do pós-teste de Bonferroni, utilizando o programa GraphPad Prism versão 8.0 (*GraphPad Software Corporation, La Jolla, California, EUA*). O nível de significância adotado foi de $p \leq 0,05$.

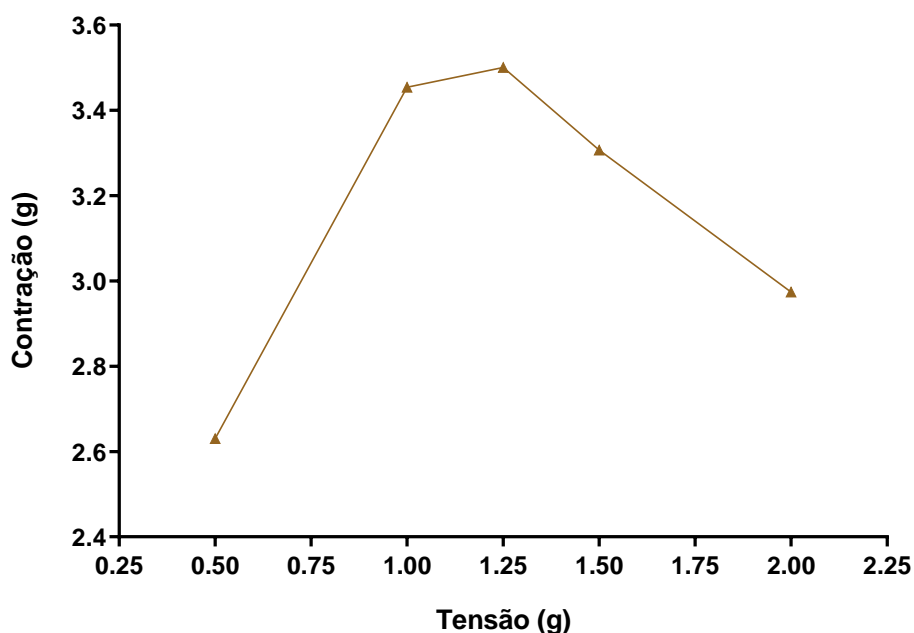
RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. Determinação da tensão basal utilizada nos experimentos para artéria aorta em de rato

O KCl induziu contração dependente da tensão basal aplicada em artérias aorta de rato. Os resultados mostraram que a contração induzida pelo KCl foi crescente entre 0,5 e 1,25 g, quando alcança a resposta contrátil máxima. Desse modo, para a realização dos ensaios funcionais na aorta torácica adotou-se a tensão de 1,0 g que corresponde a aproximadamente 80% da resposta máxima (Figura 3).

Figura 3. Curva de pré-tensão realizadas com KCl (90 mM) em anéis de aorta torácica de ratos hannover.



Fonte: Dados da Pesquisa

Nota: Tensões 0,5; 1,0; 1,25; 1,5; 2,0. Os pontos representam a média \pm EPM (n=8) da contração em resposta à solução de KCl.

5.2. Efeito da olanzapina em anéis de aorta pré-contraídos com PE

A olanzapina promoveu relaxamento, dose-dependente, em anéis com endotélio (Figura 4A), e não em anéis sem endotélio (Figura 4B), pré-contraídos com PE. Esse achado experimental demonstra que a reatividade da aorta torácica é dependente do endotélio. (Figura 5). Com esse resultado, foi determinado um protocolo para avaliar os mecanismos relacionados ao relaxamento dependente do endotélio.

Figura 4. Imagem representativa de uma curva com olanzapina em anéis de aorta isoladas com endotélio (A) e sem endotélio (B) pré contraídos com PE.

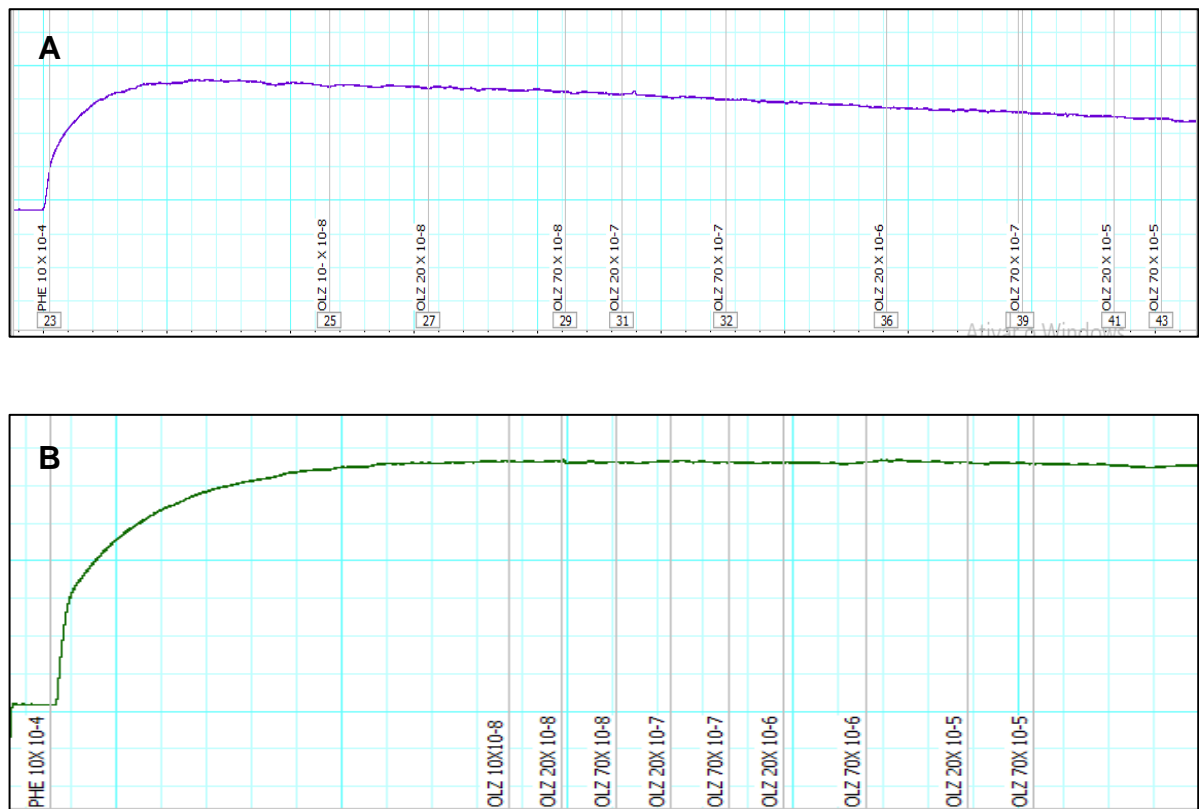
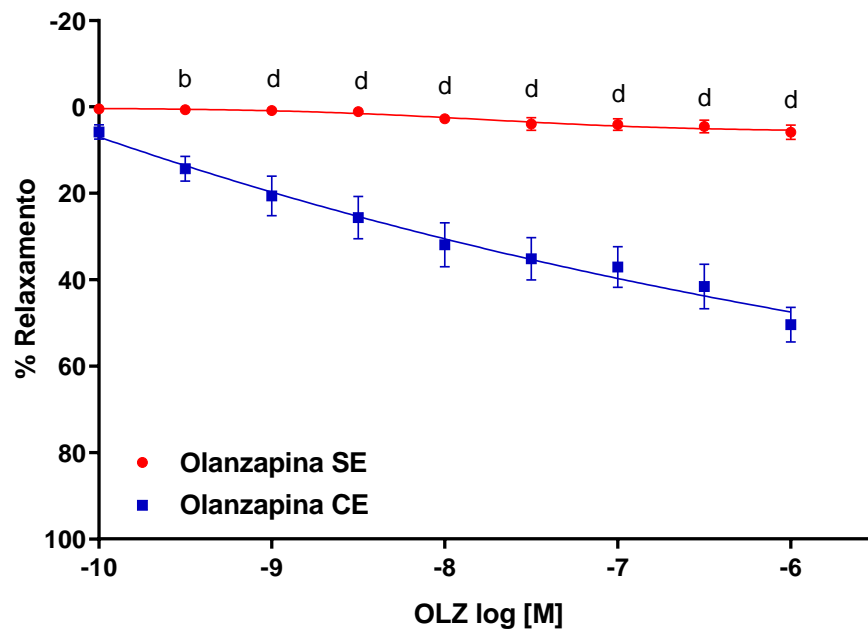


Figura 5. Curva dose-resposta para olanzapina em anéis de aorta de ratos, com e sem endotélio, pré-contraídos com PE (10^{-7} M).



Fonte: Dados da Pesquisa

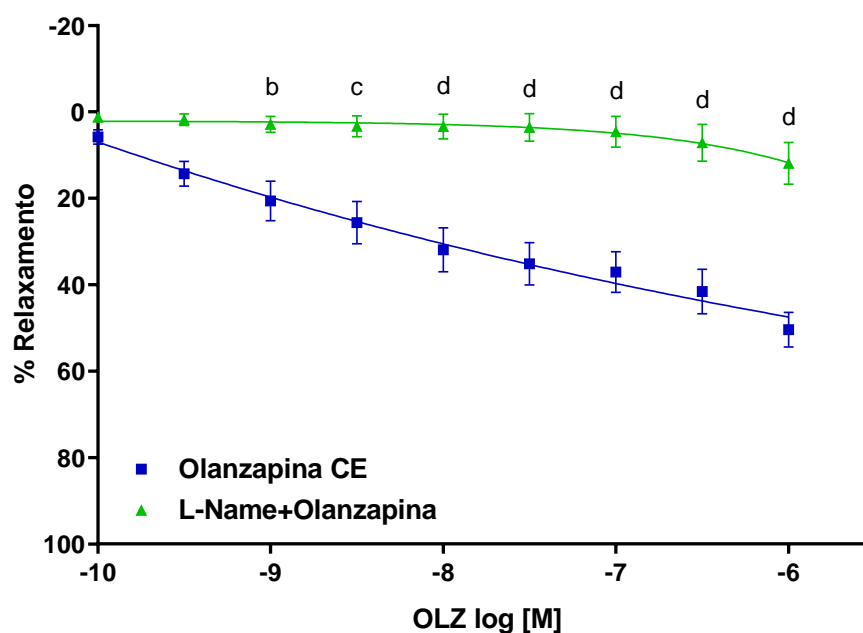
Nota: Os dados representam a média \pm EPM (n=8), two-way ANOVA, pós-teste Bonferroni (b: $p < 0,01$; d: $p < 0,0001$).

5.3. Participação da PGI₂ e do NO no relaxamento induzido pela olanzapina, em anéis de aorta pré-contraídos com PE

A olanzapina promoveu relaxamento dose e endotélio-dependente, mesmo na presença do inibidor da síntese de prostanoide, excluindo a participação da PGI₂ (Figura 7). Entretanto, o L-Name e a associação de L- Name com indometacina reduziram o relaxamento induzido pela olanzapina, de modo que o relaxamento após a inibição da NOS assemelhou-se ao obtido em anéis sem endotélio. (Figuras 6 e 8). O bloqueio do relaxamento induzido pelo ODQ, reforça ainda mais o papel da via NO/GMPc no relaxamento induzido pela olanzapina (Figura 9).

Estes resultados demonstram que o NO endotelial possivelmente foi o responsável pela potencialização do relaxamento na presença de endotélio, sem qualquer participação dos prostanoide, uma vez que a redução no relaxamento observada após incubação com L- Name não diferiu da observada quando o L- Name foi associado à indometacina.

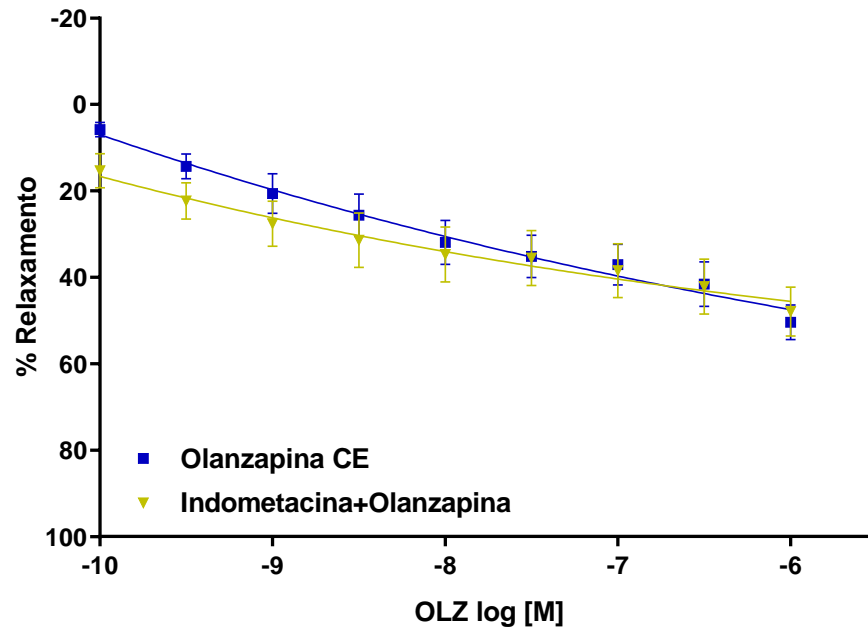
Figura 6. Curva dose-resposta para olanzapina em anéis de aorta de ratos, com endotélio, pré-contraídos com PE (10^{-7} M) na ausência e presença de L-Name (10^{-4} M).



Fonte: Dados da Pesquisa

Nota: Os dados representam a média \pm EPM (n=8), two-way ANOVA, pós-teste Bonferroni (b: $p < 0,01$; c: $p < 0,001$; d: $p < 0,0001$).

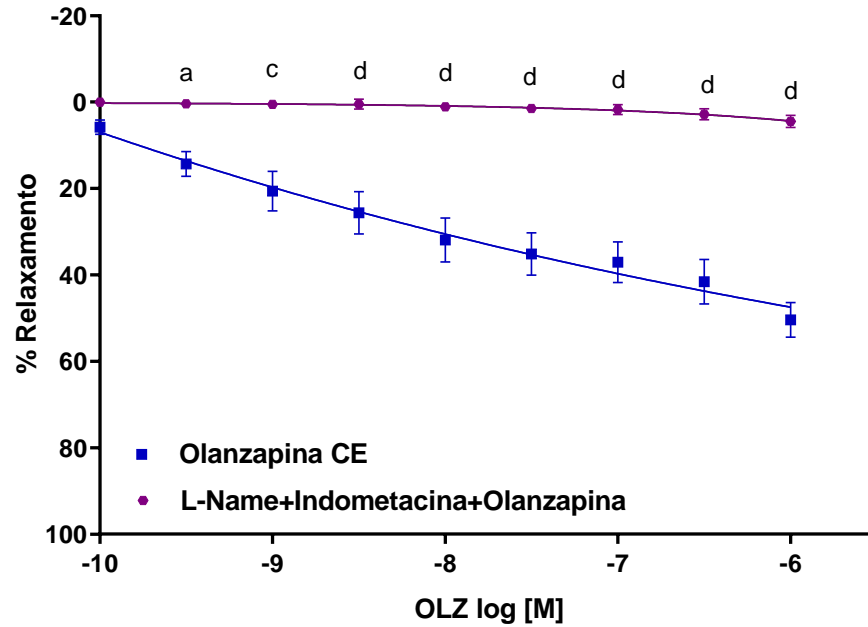
Figura 7. Curva dose-resposta para olanzapina em anéis de aorta de ratos, com endotélio, pré-contraídos com PE (10^{-7} M) na ausência e presença de Indometacina (10^{-5} M).



Fonte: Dados da Pesquisa

Nota: Os dados representam a média \pm EPM (n=8), two-way ANOVA, pós-teste Bonferroni.

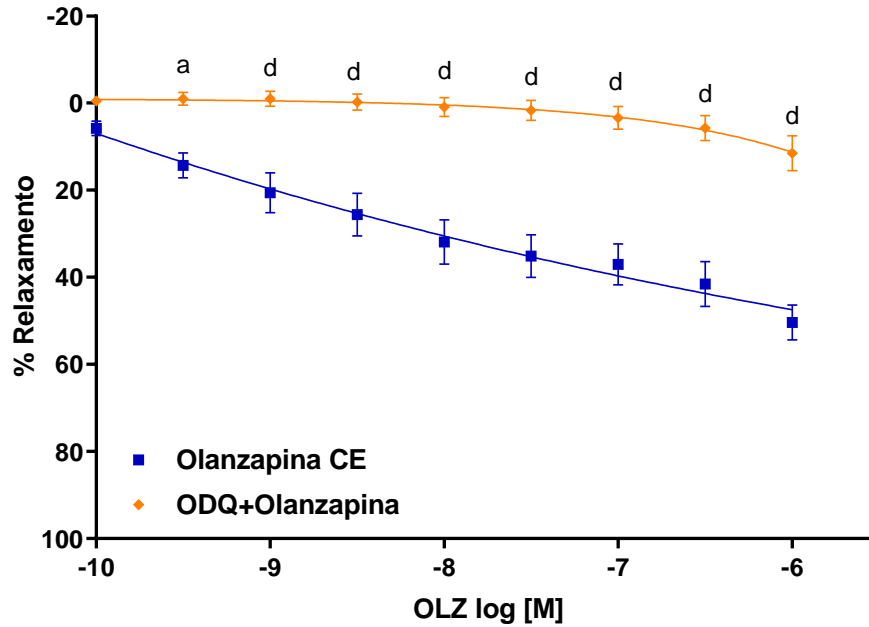
Figura 8. Curva dose-resposta para olanzapina em anéis de aorta de ratos, com endotélio, pré-contraídos com PE (10^{-7} M) na ausência e presença da associação de L-Name (10^{-4} M) e indometacina (10^{-5} M).



Fonte: Dados da Pesquisa

Nota: Os dados representam a média \pm EPM (n=8), two-way ANOVA, pós-teste Bonferroni (a: $p < 0,05$; c: $p < 0,001$; d: $p < 0,0001$).

Figura 9. Curva dose-resposta para olanzapina em anéis de aorta de ratos, com endotélio, pré-contraídos com PE (10^{-7} M) na ausência e presença de ODQ (10^{-2} M).



Fonte: Dados da Pesquisa

Nota: Os dados representam a média \pm EPM (n=8), two-way ANOVA, pós-teste Bonferroni (a: $p < 0,05$; d: $p < 0,0001$).

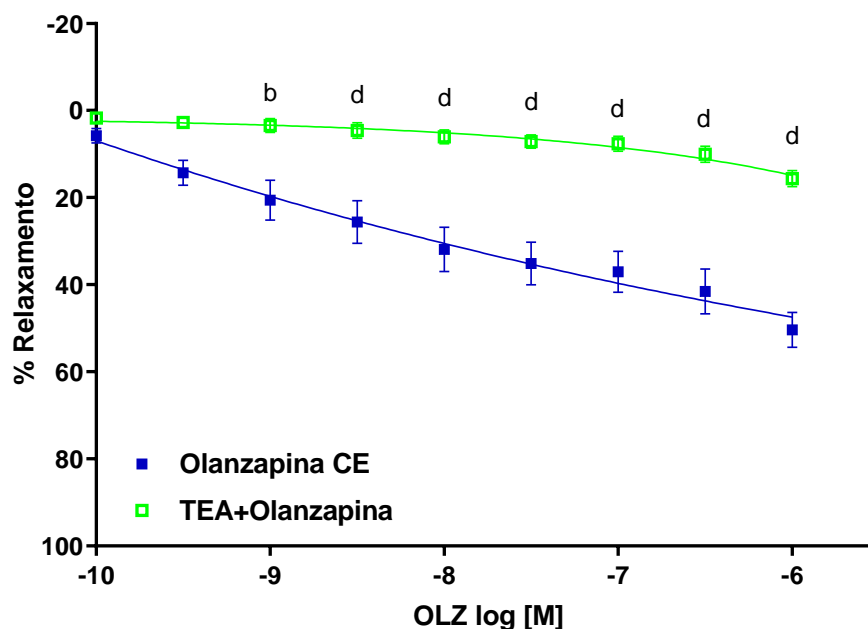
5.4. Participação dos canais para K⁺ no relaxamento induzido pela olanzapina, em anéis de aorta pré-contraídos com PE

Para investigar se o potássio poderia ter alguma participação no relaxamento induzido pela olanzapina, foram utilizados o TEA e altas concentrações de KCl, com intuito de bloquear todos os canais de potássio.

Em anéis com endotélio, tanto o TEA quanto o KCl bloquearam o relaxamento induzido pela olanzapina, revelando a participação dos canais de potássio nesta resposta vasodilatadora (Figuras 10 e 11).

Considerando que a redução do relaxamento pelo TEA e KCl foi a mesma observada pelo L-Name e ODQ, é provável que estas vias tenham uma intersecção e que a partir daí conduzam a um fator comum para indução do relaxamento.

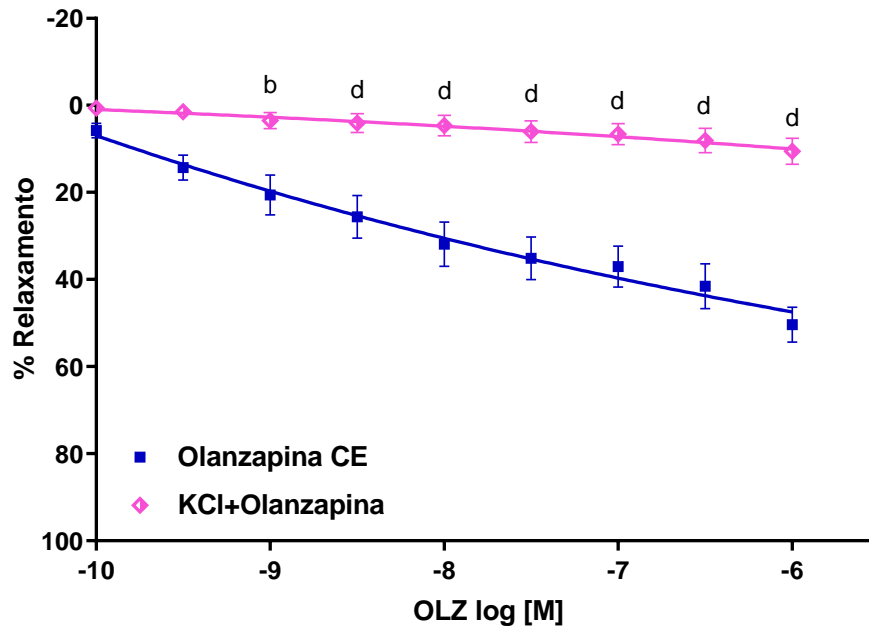
Figura 10. Curva dose-resposta para olanzapina em anéis de aorta de ratos, com endotélio, pré-contraídos com PE (10^{-7} M) na ausência e presença de TEA (1M).



Fonte: Dados da Pesquisa

Nota: Os dados representam a média \pm EPM (n=8), two-way ANOVA, pós-teste Bonferroni (b: $p < 0,01$; d: $p < 0,0001$).

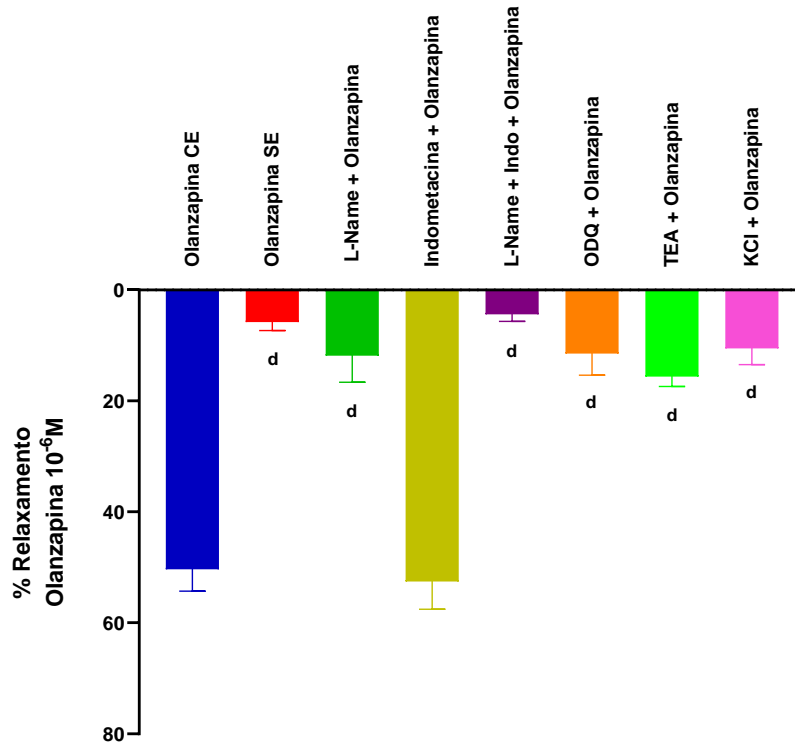
Figura 11. Curva dose-resposta para olanzapina em anéis de aorta de ratos, com endotélio, na ausência e na presença de KCl (90 mM).



Fonte: Dados da Pesquisa

Nota: Os dados representam a média \pm EPM (n=8), two-way ANOVA, pós-teste Bonferroni (b: $p < 0,01$; d: $p < 0,0001$).

Figura 12. Porcentagem total de relaxamento induzido pela olanzapina em anéis de aorta de ratos, com endotélio, pré-contraídos com PE (10^{-7} M) na ausência e na presença dos inibidores: L-Name (10^{-4} M), indometacina (10^{-5} M), ODQ (10^{-2} M) TEA (1M) e KCl (90 mM).



Fonte: Dados da Pesquisa

Nota: Os dados representam a média \pm EPM (n=8), one-way ANOVA, pós-teste Dunnett (d: $p < 0,0001$).

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

A esquizofrenia está associada a um aumento da morbidade e mortalidade, principalmente devido a distúrbios cardiovasculares. Acredita-se que as causas para essa associação sejam os cuidados somáticos inadequados, estilo de vida pouco saudável e os efeitos colaterais dos agentes antipsicóticos mais usados, os antipsicóticos atípicos, que podem causar ganho de peso e síndrome metabólica.

Esses fatores, provavelmente, convergem para a indução de vias fisiopatológicas no sistema cardiovascular subjacentes ao desenvolvimento de DCV, como a disfunção endotelial. Em um estudo com pacientes esquizofrênicos tratados com antipsicótico, 48% dos indivíduos preencheram os critérios para disfunção endotelial, a partir de avaliações realizadas por tonometria de artéria periférica (BURGHARDT; GROVE; ELLINGROD, 2014). Assim, a disfunção endotelial é um possível fenômeno celular associado a esquizofrenia, uso de antipsicótico e mortalidade cardiovascular. Corroborando esses achados Ellingrod e colaboradores (2011) também demonstraram que 50% dos indivíduos com esquizofrenia atendem aos critérios para disfunção endotelial, avaliada com tonometria de artéria periférica (ELLINGROD; TAYLOR; BROOK; EVANS *et al.*, 2011). Os autores relatam ainda que pelo menos 40% dos indivíduos esquizofrênicos avaliados, atendem também aos critérios de síndrome metabólica. Quanto ao uso de antipsicótico, foi verificado que o impacto positivo sobre o endotélio, de uma alimentação rica em ômega 3, deixou de ser observado nos pacientes em uso de antipsicótico.

Os resultados presentes na literatura, até o momento, mostram que não há dados consistentes sobre o real impacto da esquizofrenia na função vascular e conseqüentemente nas DCV, e menos ainda sobre qual seria o impacto do tratamento com os antipsicóticos. Nos últimos anos, esforços têm sido feitos no sentido desvendar a associação entre o uso de antipsicótico e a ocorrência de DCV.

O endotélio é um órgão vital que tem recebido importante atenção devido à sua relação com a DCV. Ele é composto por uma camada única de células que revestem todos os vasos sanguíneos, e representa um órgão importante por seus efeitos na regulação do tônus vasomotor, trombose, inflamação, adesão plaquetária e leucocitária e permeabilidade vascular. A possibilidade de medir o funcionamento endotelial pode auxiliar em prever o risco de um indivíduo desenvolver DCV. Tais medidas são possíveis a partir da análise por tonometria de amplitude de pulso na

ponta do dedo, um método não invasivo para medir a vasodilatação dependente do endotélio, de pequenos vasos (arteríola), e determinar a saúde vascular dentro do ambiente clínico ambulatorial (BONETTI; PUMPER; HIGANO; HOLMES *et al.*, 2004; KUVIN; PATEL; SLINEY; PANDIAN *et al.*, 2003). Associados a essa tecnologia, também estão os marcadores endógenos de disfunção endotelial, como a dimetilarginina assimétrica (ADMA).

A ADMA, um inibidor endógeno da NOS, e a relação L-arginina/ADMA são marcadores de disfunção endotelial que predizem mortalidade e desfecho adverso em uma série de DCV. O aumento dos níveis de ADMA também pode estar associado a ocorrência de estresse oxidativo.

Os níveis plasmáticos de ADMA foram investigados em três estudos com pacientes esquizofrênicos. Das e colaboradores (1996), mostraram que a ADMA plasmática estava elevada em alguns pacientes, durante o primeiro episódio da doença, e que, portanto, não faziam uso de antipsicótico (DAS; KHAN; PURI; HIRSCH, 1996). Celik e colaboradores (2011), demonstraram que os níveis plasmáticos de ADMA estavam aumentados em pacientes com esquizofrenia tanto no primeiro episódio quanto após episódios múltiplos da doença. A ADMA não foi correlacionada com a sintomatologia, mas foi maior em pacientes com múltiplos versus pacientes de primeiro episódio (CELIK; CAYCI; OZDEMIR; AKGUL *et al.*, 2011). Zincir e colaboradores (2014), mostraram que a ADMA plasmática foi 3 vezes maior em pacientes com primeiro episódio de esquizofrenia em comparação com controles saudáveis, e que estes doentes apresentaram uma redução de 50% da ADMA após dois meses de tratamento com antipsicótico (ZINCIR; ZINCIR; DORUK; ERDEM *et al.*, 2014).

Contradizendo os resultados anteriores, Jorgensen e colaboradores (2015) não encontraram qualquer alteração nos níveis de ADMA plasmático em pacientes esquizofrênicos e tratados com antipsicótico (JORGENSEN; KNORR; SOENDERGAARD; LYKKESFELDT *et al.*, 2015). Considerando os achados de Zincir e colaboradores (2014), essa disparidade de resultados poderia ser atribuída ao próprio tratamento com antipsicótico, uma vez que os medicamentos foram capazes de reduzir a ADMA (ZINCIR; ZINCIR; DORUK; ERDEM *et al.*, 2014) .

Considerando a importância da função endotelial no desenvolvimento de DVC, sua prevalência aumentada na esquizofrenia e a contribuição ou não dos antipsicóticos para este contexto, os resultados encontrados no presente estudo se

tornam de grande importância quando associados aos achados a partir de avaliações, *in vivo* não invasiva, da disfunção endotelial e a análises de biomarcadores plasmáticos de função endotelial.

No presente estudo, foram utilizadas técnicas de vaso isolado. Desta forma, as influências dos mecanismos de controle local (como por exemplo, o shear stress) e neuro-humoral do tônus foram eliminadas, garantindo que as respostas vasculares observadas pudessem ser atribuídas especificamente ao efeito direto da olanzapina sobre o vaso. Entretanto, é importante salientar que em condições fisiológicas todos os mecanismos de controle do tônus poderiam interagir, resultando em uma resposta vascular diferente da observada neste estudo. Portanto, o fato do estudo ser realizado *in vitro* não nos permite extrapolar os resultados, deliberadamente, para o que ocorre no organismo do paciente, ao receber tal medicação. Ao mesmo tempo tais dados, associados aos já existentes na literatura, são importantes para abrir novas perspectivas em relação ao efeito dos antipsicóticos sobre a vasculatura e diferenciá-los dos efeitos metabólicos destes medicamentos.

O presente trabalho mostrou que a olanzapina não alterou o tônus de anéis sem endotélio, pré-contraídos com PE. Porém induziu relaxamento, dose-dependente em anéis com endotélio, também pré-contraídos com PE. Foi observado também que o relaxamento, induzido pela olanzapina, foi mediado pela ativação da via NO/GMPc e canais de potássio, mas não por prostanoide.

Os resultados observados no presente estudo mostram a importância maciça da via NO/GMPc no relaxamento induzido pela olanzapina, resultado este que difere do encontrado por Mateus e colaboradores (2019), utilizando a clozapina. Os autores mostraram que embora haja uma pequena participação da via NO/GMPc e PGI₂/AMPc, o relaxamento induzido pela clozapina foi parcialmente dependente do endotélio e predominantemente mediado por canais de K_{ATP}. Considerando a diversidade de receptores pelos quais os antipsicóticos têm afinidade, é justificável observar diferença nos mecanismos de ação envolvidos no relaxamento (MATEUS; ALBUQUERQUE; CELOTTO; EVORA, 2019).

O relaxamento induzido pela olanzapina foi bloqueado na mesma magnitude pelo L-Name, ODQ, altas concentrações de KCl e TEA. Tais achados sugerem que o relaxamento poderia ser mediado por uma única via de sinalização e que os inibidores empregados no estudo estariam realizando o bloqueio em pontos diferentes desta via.

Considerando que a produção de NO, na célula endotelial, se inicia pelo estímulo de um receptor ligado a proteínas G, e que a partir daí uma cascata de segundos mensageiros é acionada (PLC, IP₃, cálcio, calmodulina) até culminar na ativação da NOS, o L-Name seria responsável pelo bloqueio desta via de sinalização logo no início. Uma vez produzido, o NO se difunde para as células musculares lisas vasculares onde se liga a GCs ativando-a e aumentando a formação de GMPc (BRUCKDORFER, 2005; MAXWELL, 2002; WALFORD; LOSCALZO, 2003). Neste ponto da via, o bloqueio foi realizado pelo ODQ sobre a GC. Ao analisarmos as curvas apresentadas pelo uso de L-Name e ODQ podemos constatar que a magnitude de inibição foi a mesma.

A continuidade desta via depende da redução na concentração intracelular de Ca²⁺ ([Ca²⁺]_i) e inibição da fosforilação da miosina acarretando relaxamento (BRUCKDORFER, 2005; MORGADO; CAIRRAO; SANTOS-SILVA; VERDE, 2012b; WALFORD; LOSCALZO, 2003). O GMP produzido, bloqueia os canais para Ca²⁺ dependentes de voltagem presentes na membrana celular e ativa a PKG, que por sua vez fosforila proteínas do retículo, dentre elas a *phospholamban*, responsável pela ativação da ATPase do retículo sarcoplasmático que sequestra Ca²⁺ para dentro do retículo sarcoplasmático (MORGADO; CAIRRAO; SANTOS-SILVA; VERDE, 2012b; WALFORD; LOSCALZO, 2003).

A PKG, produzida a partir da ativação da GC/GMPc além das ações acima citadas, fosforila também os canais para K⁺ ativados por Ca²⁺ de alta condutância, aumentando o efluxo de K⁺ e promovendo relaxamento (BRUCKDORFER, 2005; MORGADO; CAIRRAO; SANTOS-SILVA; VERDE, 2012b). O uso do TEA e de altas concentrações de KCl são capazes de bloquear de maneira inespecífica os diversos canais de potássio, ou seja, o uso destes inibidores levou a um bloqueio do relaxamento mais ao final da via de sinalização, onde os canais de potássio têm importante participação. Ademais, O NO também pode ativar diretamente os canais BK_{Ca}, ou seja, o próprio L-Name, através da redução de NO, poderia ser responsável por bloqueio destes canais de potássio.

O uso dos diferentes inibidores empregados no presente estudo nos permitiram traçar, em detalhes, a via de sinalização envolvida no relaxamento induzido pela olanzapina. Conhecer estes mecanismos permite a realização de intervenções mais precisas quando necessário.

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

Considerando os resultados encontrados no presente estudo sobre a olanzapina e os resultados anteriormente demonstrados pelo grupo sobre a clozapina, poderíamos inferir que os antipsicóticos não seriam os responsáveis pelo aumento na ocorrência de doenças cardiovasculares em pacientes esquizofrênicos tratados, ao que diz respeito ao efeito desta classe de fármacos sobre a vasculatura. Entretanto, o perfil metabólico induzido pelos antipsicóticos não foi considerado neste estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, R. F. Antipsicótico de Segunda Geração no Tratamento de Esquizofrenia. **Revista Acadêmica Oswaldo Cruz**, 2, n. 7, p. 1-14, 2015.

BEAUCHEMIN, M.; GEGUCHADZE, R.; GUNTUR, A. R.; NEVOLA, K. *et al.* Exploring mechanisms of increased cardiovascular disease risk with antipsychotic medications: Risperidone alters the cardiac proteomic signature in mice. **Pharmacol Res**, 152, p. 104589, Feb 2020.

BERGE, J.; ABRI, P.; ANDELL, P.; MOVAHED, P. *et al.* Associations between off-label low-dose olanzapine or quetiapine and cardiometabolic mortality. **J Psychiatr Res**, 149, p. 352-358, May 2022.

BOIKO, A. S.; MEDNOVA, I. A.; KORNETOVA, E. G.; GERASIMOVA, V. I. *et al.* Cytokine Level Changes in Schizophrenia Patients with and without Metabolic Syndrome Treated with Atypical Antipsychotics. **Pharmaceuticals (Basel)**, 14, n. 5, May 9 2021.

BONETTI, P. O.; PUMPER, G. M.; HIGANO, S. T.; HOLMES, D. R., Jr. *et al.* Noninvasive identification of patients with early coronary atherosclerosis by assessment of digital reactive hyperemia. **J Am Coll Cardiol**, 44, n. 11, p. 2137-2141, Dec 7 2004.

BRANDER, G.; ISOMURA, K.; CHANG, Z.; KUJA-HALKOLA, R. *et al.* Association of Tourette Syndrome and Chronic Tic Disorder With Metabolic and Cardiovascular Disorders. **JAMA Neurol**, 76, n. 4, p. 454-461, Apr 1 2019.

BRENNAND, K. J.; SIMONE, A.; JOU, J.; GELBOIN-BURKHART, C. *et al.* Modelling schizophrenia using human induced pluripotent stem cells. **Nature**, 473, n. 7346, p. 221-225, May 12 2011.

BRUCKDORFER, R. The basics about nitric oxide. **Mol Aspects Med**, 26, n. 1-2, p. 3-31, Feb-Apr 2005.

BRYAN, R. M., Jr.; YOU, J.; GOLDING, E. M.; MARRELLI, S. P. Endothelium-derived hyperpolarizing factor: a cousin to nitric oxide and prostacyclin. **Anesthesiology**, 102, n. 6, p. 1261-1277, Jun 2005.

BURGHARDT, K.; GROVE, T.; ELLINGROD, V. Endothelial nitric oxide synthetase genetic variants, metabolic syndrome and endothelial function in schizophrenia. **J Psychopharmacol**, 28, n. 4, p. 349-356, Apr 2014.

BYMASTER, F. P.; RASMUSSEN, K.; CALLIGARO, D. O.; NELSON, D. L. *et al.* In vitro and in vivo biochemistry of olanzapine: a novel, atypical antipsychotic drug. **J Clin Psychiatry**, 58 Suppl 10, p. 28-36, 1997.

CAMPBELL, W. B.; FLEMING, I. Epoxyeicosatrienoic acids and endothelium-dependent responses. **Pflugers Arch**, 459, n. 6, p. 881-895, May 2010.

CAO, H.; MENG, Y.; LI, X.; MA, X. *et al.* The metabolic effects of antipsychotics in the early stage of treatment in first-episode patients with schizophrenia: A real-world study in a naturalistic setting. **J Psychiatr Res**, 129, p. 265-271, Oct 2020.

CARPENE, C.; LES, F.; MERCADER, J.; GOMEZ-ZORITA, S. *et al.* Opipramol Inhibits Lipolysis in Human Adipocytes without Altering Glucose Uptake and Differently from Antipsychotic and Antidepressant Drugs with Adverse Effects on Body Weight Control. **Pharmaceuticals (Basel)**, 13, n. 3, Mar 5 2020.

CARTERI, R. B.; OSES, J. P.; CARDOSO, T. A.; MOREIRA, F. P. *et al.* A closer look at the epidemiology of schizophrenia and common mental disorders in Brazil. **Dement Neuropsychol**, 14, n. 3, p. 283-289, Jul-Sep 2020.

CATAK, Z.; KAYA, H.; KOCDEMIR, E.; UGUR, K. *et al.* Interaction of apelin, elabela and nitric oxide in schizophrenia patients. **J Med Biochem**, 39, n. 2, p. 184-190, Jan 23 2020.

CELIK, C.; CAYCI, T.; OZDEMIR, B.; AKGUL, E. O. *et al.* Plasma asymmetric dimethylarginine (ADMA) concentrations in patients with first and multiple episode schizophrenia. **Psychiatry Res**, 190, n. 2-3, p. 177-180, Dec 30 2011.

CELOTTO, A. C.; CAPELLINI, V. K.; BALDO, C. F.; DALIO, M. B. *et al.* Effects of acid-base imbalance on vascular reactivity. **Braz J Med Biol Res**, 41, n. 6, p. 439-445, Jun 2008.

CHEN, C. H.; SHYUE, S. K.; HSU, C. P.; LEE, T. S. Atypical Antipsychotic Drug Olanzapine Deregulates Hepatic Lipid Metabolism and Aortic Inflammation and Aggravates Atherosclerosis. **Cell Physiol Biochem**, 50, n. 4, p. 1216-1229, 2018.

CHEN, Y.; ZHANG, F.; YAN, Y.; WANG, S. *et al.* Sudden Cardiac Death in Schizophrenia During Hospitalization: An Autopsy-Based Study. **Front Psychiatry**, 13, p. 933025, 2022.

CHIEN, S.; LI, S.; SHYY, Y. J. Effects of mechanical forces on signal transduction and gene expression in endothelial cells. **Hypertension**, 31, n. 1 Pt 2, p. 162-169, Jan 1998.

CORRELL, C. U.; SOLMI, M.; CROATTO, G.; SCHNEIDER, L. K. *et al.* Mortality in people with schizophrenia: a systematic review and meta-analysis of relative risk and aggravating or attenuating factors. **World Psychiatry**, 21, n. 2, p. 248-271, Jun 2022.

DAS, I.; KHAN, N. S.; PURI, B. K.; HIRSCH, S. R. Elevated endogenous nitric oxide synthase inhibitor in schizophrenic plasma may reflect abnormalities in brain nitric oxide production. **Neurosci Lett**, 215, n. 3, p. 209-211, Sep 13 1996.

DE-OLIVEIRA, J. L.; DA-SILVA, I. R.; RAMIS, T. R.; FERREIRA, C. V. *et al.* Endothelial function and lipid profile of individuals with schizophrenia participating in a supported employment program. **Rev Bras Med Trab**, 16, n. 2, p. 167-174, 2018.

DE MELO, P. F. O Comportamento Cardiovascular Pós-Teste Ergométrico em Pacientes com Diferentes Etiologias de Insuficiência Cardíaca. 2014.

DE NUCCI, G.; GRYGLEWSKI, R. J.; WARNER, T. D.; VANE, J. R. Receptor-mediated release of endothelium-derived relaxing factor and prostacyclin from bovine aortic endothelial cells is coupled. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 85, n. 7, p. 2334-2338, Apr 1988.

DI LORENZO, R.; BROGLI, A. Profile of olanzapine long-acting injection for the maintenance treatment of adult patients with schizophrenia. **Neuropsychiatr Dis Treat**, 6, p. 573-581, Sep 7 2010.

DIJKSTRA, M. E.; VAN DER WEIDEN, C. F. S.; SCHOL-GELOK, S.; MULLER-HANSMA, A. H. G. *et al.* Venous thrombosis during olanzapine treatment: a complex association. **Neth J Med**, 76, n. 6, p. 263-268, Aug 2018.

ELLINGROD, V. L.; GROVE, T. B.; BURGHARDT, K. J.; TAYLOR, S. F. *et al.* The effect of folate supplementation and genotype on cardiovascular and epigenetic measures in schizophrenia subjects. **NPJ Schizophr**, 1, p. 15046, 2015.

ELLINGROD, V. L.; TAYLOR, S. F.; BROOK, R. D.; EVANS, S. J. *et al.* Dietary, lifestyle and pharmacogenetic factors associated with arteriole endothelial-dependent vasodilatation in schizophrenia patients treated with atypical antipsychotics (AAPs). **Schizophr Res**, 130, n. 1-3, p. 20-26, Aug 2011.

FELETOU, M.; VANHOUTTE, P. M. EDHF: an update. **Clin Sci (Lond)**, 117, n. 4, p. 139-155, Jul 16 2009.

FIELD, J. R.; WALKER, A. G.; CONN, P. J. Targeting glutamate synapses in schizophrenia. **Trends Mol Med**, 17, n. 12, p. 689-698, Dec 2011.

FITZGERALD, S. M.; KEMP-HARPER, B. K.; TARE, M.; PARKINGTON, H. C. Role of endothelium-derived hyperpolarizing factor in endothelial dysfunction during diabetes. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, 32, n. 5-6, p. 482-487, May-Jun 2005.

FREEDMAN, R. Schizophrenia. **N Engl J Med**, 349, n. 18, p. 1738-1749, Oct 30 2003.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, 288, n. 5789, p. 373-376, Nov 27 1980.

GOLDING, E. M.; MARRELLI, S. P.; YOU, J.; BRYAN, R. M., Jr. Endothelium-derived hyperpolarizing factor in the brain: a new regulator of cerebral blood flow? **Stroke**, 33, n. 3, p. 661-663, Mar 2002.

GREENE, C.; KEALY, J.; HUMPHRIES, M. M.; GONG, Y. *et al.* Dose-dependent expression of claudin-5 is a modifying factor in schizophrenia. **Mol Psychiatry**, 23, n. 11, p. 2156-2166, Nov 2018.

GRYGLEWSKI, R. J. Prostacyclin among prostanoids. **Pharmacol Rep**, 60, n. 1, p. 3-11, Jan-Feb 2008.

GULAC, P.; ARNOLD, M.; GRMAN, M.; CARREL, T. *et al.* Olanzapine-mediated cardiotoxicity is associated with altered energy metabolism in isolated rat hearts. **Acta Biochim Pol**, 67, n. 1, p. 15-23, Jan 30 2020.

GUNDUGURTI, P. R.; BHATTACHARYYA, R.; KONERU, A. Management of Psychiatric Disorders in Patients with Cardiovascular Diseases. **Indian J Psychiatry**, 64, n. Suppl 2, p. S355-S365, Mar 2022.

HATTORI, K. e. a. Augmentation of NO-mediated vasodilation in metabolic acidosis. 2002.

HELIO ELKIS, C. G., Henrique Suplicy, Marcos Tambascia, Rodrigo Bressan, Ruy Lyra, Saulo Cavalcante, Walter Minicucci, . Consenso Brasileiro sobre antipsicóticos de segunda geração e distúrbios metabólicos. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, 30, n. 1, p. 77-85, 2008.

HENNEKENS, C. H.; HENNEKENS, A. R.; HOLLAR, D.; CASEY, D. E. Schizophrenia and increased risks of cardiovascular disease. **Am Heart J**, 150, n. 6, p. 1115-1121, Dec 2005.

IGNARRO, L. J.; BUGA, G. M.; WOOD, K. S.; BYRNS, R. E. *et al.* Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 84, n. 24, p. 9265-9269, Dec 1987.

JORGENSEN, A.; KNORR, U.; SOENDERGAARD, M. G.; LYKKESFELDT, J. *et al.* Asymmetric dimethylarginine in somatically healthy schizophrenia patients treated with atypical antipsychotics: a case-control study. **BMC Psychiatry**, 15, p. 67, Apr 3 2015.

KO, E. A.; HAN, J.; JUNG, I. D.; PARK, W. S. Physiological roles of K⁺ channels in vascular smooth muscle cells. **J Smooth Muscle Res**, 44, n. 2, p. 65-81, Apr 2008.

KOMOSSA, K.; RUMMEL-KLUGE, C.; HUNGER, H.; SCHMID, F. *et al.* Olanzapine versus other atypical antipsychotics for schizophrenia. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 3, p. CD006654, Mar 17 2010.

KUVIN, J. T.; PATEL, A. R.; SLINEY, K. A.; PANDIAN, N. G. *et al.* Assessment of peripheral vascular endothelial function with finger arterial pulse wave amplitude. **Am Heart J**, 146, n. 1, p. 168-174, Jul 2003.

LAZZARI, P.; SERRA, V.; MARCELLO, S.; PIRA, M. *et al.* Metabolic side effects induced by olanzapine treatment are neutralized by CB1 receptor antagonist compounds co-administration in female rats. **Eur Neuropsychopharmacol**, 27, n. 7, p. 667-678, Jul 2017.

LERTKIATMONGKOL, P.; LIAO, D.; MEI, H.; HU, Y. *et al.* Endothelial functions of platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31). **Curr Opin Hematol**, 23, n. 3, p. 253-259, May 2016.

LI, R.; ZHANG, Y.; ZHU, W.; DING, C. *et al.* Effects of olanzapine treatment on lipid profiles in patients with schizophrenia: a systematic review and meta-analysis. **Sci Rep**, 10, n. 1, p. 17028, Oct 12 2020.

LIN, Y.; PENG, Y.; HE, S.; XU, J. *et al.* Serum IL-1ra, a novel biomarker predicting olanzapine-induced hypercholesterolemia and hyperleptinemia in schizophrenia. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, 84, n. Pt A, p. 71-78, Jun 8 2018.

LODGE, D. J.; GRACE, A. A. Hippocampal dysregulation of dopamine system function and the pathophysiology of schizophrenia. **Trends Pharmacol Sci**, 32, n. 9, p. 507-513, Sep 2011.

LUKSHA, L.; AGEWALL, S.; KUBLICKIENE, K. Endothelium-derived hyperpolarizing factor in vascular physiology and cardiovascular disease. **Atherosclerosis**, 202, n. 2, p. 330-344, Feb 2009.

MAHER, S.; CUNNINGHAM, A.; O'CALLAGHAN, N.; BYRNE, F. *et al.* Clozapine-induced hypersalivation: an estimate of prevalence, severity and impact on quality of life. **Ther Adv Psychopharmacol**, 6, n. 3, p. 178-184, Jun 2016.

MARUHASHI, T.; IWAMOTO, Y.; KAJIKAWA, M.; ODA, N. *et al.* Interrelationships Among Flow-Mediated Vasodilation, Nitroglycerine-Induced Vasodilation, Baseline Brachial Artery Diameter, Hyperemic Shear Stress, and Cardiovascular Risk Factors. **J Am Heart Assoc**, 7, n. 1, Dec 29 2017.

MATEUS, L. S.; ALBUQUERQUE, A. A. S.; CELOTTO, A. C.; EVORA, P. R. B. In vitro evidence that endothelium-dependent vasodilatation induced by clozapine is mediated by an ATP-sensitive potassium channel. **Pharmacol Rep**, 71, n. 3, p. 522-527, Jun 2019.

MAXWELL, A. J. Mechanisms of dysfunction of the nitric oxide pathway in vascular diseases. **Nitric Oxide**, 6, n. 2, p. 101-124, Mar 2002.

MONCADA, S.; GRYGLEWSKI, R.; BUNTING, S.; VANE, J. R. An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. **Nature**, 263, n. 5579, p. 663-665, Oct 21 1976.

MOREIRA, F. A.; GUIMARÃES, F. S. Mecanismos de ação dos Antipsicóticos Hipóteses Dopaminérgicas. 40, n. 1, p. 63-71, 2007a.

MOREIRA, F. A.; GUIMARÃES, F. S. Mecanismos de ação dos AntipsicóticosÇ Hipóteses Dopaminérgicas. 40, n. 1, p. 63-71, 2007b.

MORGADO, M.; CAIRRAO, E.; SANTOS-SILVA, A. J.; VERDE, I. Cyclic nucleotide-dependent relaxation pathways in vascular smooth muscle. **Cell Mol Life Sci**, 69, n. 2, p. 247-266, Jan 2012a.

MORGADO, M.; CAIRRAO, E.; SANTOS-SILVA, A. J.; VERDE, I. Cyclic nucleotide-dependent relaxation pathways in vascular smooth muscle. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, 69, n. 2, p. 247-266, Jan 2012b.

NARUMIYA, S.; SUGIMOTO, Y.; USHIKUBI, F. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. **Physiol Rev**, 79, n. 4, p. 1193-1226, Oct 1999.

NASRALLAH, H. A. Atypical antipsychotic-induced metabolic side effects: insights from receptor-binding profiles. **Mol Psychiatry**, 13, n. 1, p. 27-35, Jan 2008.

NASYROVA, R. F.; IVASHCHENKO, D. V.; IVANOV, M. V.; NEZNANOV, N. G. Role of nitric oxide and related molecules in schizophrenia pathogenesis: biochemical, genetic and clinical aspects. **Front Physiol**, 6, p. 139, 2015.

NGUYEN, T. T.; DEV, S. I.; CHEN, G.; LIOU, S. C. *et al.* Abnormal levels of vascular endothelial biomarkers in schizophrenia. **Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci**, 268, n. 8, p. 849-860, Dec 2018.

O'GALLAGHER, K.; TEO, J. T.; SHAH, A. M.; GAUGHRAN, F. Interaction Between Race, Ethnicity, Severe Mental Illness, and Cardiovascular Disease. **J Am Heart Assoc**, 11, n. 12, p. e025621, Jun 21 2022.

ORIE, N. N.; CLAPP, L. H. Role of prostanoid IP and EP receptors in mediating vasorelaxant responses to PGI₂ analogues in rat tail artery: Evidence for Gi/o modulation via EP₃ receptors. **Eur J Pharmacol**, 654, n. 3, p. 258-265, Mar 11 2011.

PADERINA, D. Z.; BOIKO, A. S.; POZHIDAEV, I. V.; MEDNOVA, I. A. *et al.* The Gender-Specific Association of DRD2 Polymorphism with Metabolic Syndrome in Patients with Schizophrenia. **Genes (Basel)**, 13, n. 8, Jul 23 2022.

PALMER, R. M.; FERRIGE, A. G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, 327, n. 6122, p. 524-526, Jun 11-17 1987.

PELLIGRINO, D. A.; WANG, Q. Cyclic nucleotide crosstalk and the regulation of cerebral vasodilation. **Prog Neurobiol**, 56, n. 1, p. 1-18, Oct 1998.

PEREZ-COSTAS, E.; MELENDEZ-FERRO, M.; ROBERTS, R. C. Basal ganglia pathology in schizophrenia: dopamine connections and anomalies. **J Neurochem**, 113, n. 2, p. 287-302, Apr 2010.

PITSIKAS, N. The role of nitric oxide donors in schizophrenia: Basic studies and clinical applications. **Eur J Pharmacol**, 766, p. 106-113, Nov 5 2015.

RADU, G.; LUCA, C.; PETRESCU, L.; BORDEJEVIC, D. A. *et al.* The Predictive Value of Endothelial Inflammatory Markers in the Onset of Schizophrenia. **Neuropsychiatr Dis Treat**, 16, p. 545-555, 2020.

RAIA, L.; ZAFRANI, L. Endothelial Activation and Microcirculatory Disorders in Sepsis. **Front Med (Lausanne)**, 9, p. 907992, 2022.

RANG, H. P.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J.; HENDERSON, G. **Farmacologia**. 8^a ed. Elsevier, 2016.

RÊGO, J. F.; DE MOURA, J. I.; MOITA, G. C. Determinação de Olanzapina em Formulações Farmaceuticas Por espectrofotometria: Desenvolvimento e Validação. **Quimica Nova**, Vol. 33, No. 2, 471-477, 2010, 33, n. 2, p. 471-477, 2010.

SHAH, R.; SUBHAN, F.; ALI, G.; ULLAH, I. *et al.* Olanzapine induced biochemical and histopathological changes after its chronic administration in rats. **Saudi Pharm J**, 24, n. 6, p. 698-704, Nov 2016.

SHARMA, T.; HUGHES, C.; SONI, W.; KUMARI, V. Cognitive effects of olanzapine and clozapine treatment in chronic schizophrenia. **Psychopharmacology (Berl)**, 169, n. 3-4, p. 398-403, Sep 2003.

SMITH, J.; GRIFFITHS, L. A.; BAND, M.; HIRD-SMITH, R. *et al.* Early Intervention in Psychosis: Effectiveness and Implementation of a Combined Exercise and Health Behavior Intervention Within Routine Care. **Front Endocrinol (Lausanne)**, 11, p. 577691, 2020.

SOLMI, M.; TIIHONEN, J.; LAHTEENVUO, M.; TANSKANEN, A. *et al.* Antipsychotics Use Is Associated With Greater Adherence to Cardiometabolic Medications in Patients With Schizophrenia: Results From a Nationwide, Within-subject Design Study. **Schizophr Bull**, 48, n. 1, p. 166-175, Jan 21 2022.

TAIPALE, H.; TANSKANEN, A.; MEHTALA, J.; VATTULAINEN, P. *et al.* 20-year follow-up study of physical morbidity and mortality in relationship to antipsychotic treatment in a nationwide cohort of 62,250 patients with schizophrenia (FIN20). **World Psychiatry**, 19, n. 1, p. 61-68, Feb 2020.

TANAKA, Y.; KOIKE, K.; TORO, L. MaxiK channel roles in blood vessel relaxations induced by endothelium-derived relaxing factors and their molecular mechanisms. **J Smooth Muscle Res**, 40, n. 4-5, p. 125-153, Oct 2004.

TAO, Q.; MIAO, Y.; LI, H.; YUAN, X. *et al.* Insulin Resistance and Oxidative Stress: In Relation to Cognitive Function and Psychopathology in Drug-Naive, First-Episode Drug-Free Schizophrenia. **Front Psychiatry**, 11, p. 537280, 2020.

TIEN, A. Y.; EATON, W. W. Psychopathologic precursors and sociodemographic risk factors for the schizophrenia syndrome. **Arch Gen Psychiatry**, 49, n. 1, p. 37-46, Jan 1992.

TITULAER, J.; RADHE, O.; MAZRINA, J.; STROM, A. *et al.* Sodium nitroprusside enhances the antipsychotic-like effect of olanzapine but not clozapine in the conditioned avoidance response test in rats. **Eur Neuropsychopharmacol**, 60, p. 48-54, Jul 2022.

VETTER, M. W.; MARTIN, B. J.; FUNG, M.; PAJEVIC, M. *et al.* Microvascular dysfunction in schizophrenia: a case-control study. **NPJ Schizophr**, 1, p. 15023, 2015.

WACLAWOVSKY, A. J.; DE BRITO, E.; SMITH, L.; VANCAMPFORT, D. *et al.* Endothelial dysfunction in people with depressive disorders: A systematic review and meta-analysis. **J Psychiatr Res**, 141, p. 152-159, Sep 2021.

WAJCHENBERG, B. L. Disfunção Endotelial no Diabetes do Tipo 2. 2002.

WALFORD, G.; LOSCALZO, J. Nitric oxide in vascular biology. **J Thromb Haemost**, 1, n. 10, p. 2112-2118, Oct 2003.

WEI, Y.; YAN, V. K. C.; KANG, W.; WONG, I. C. K. *et al.* Association of Long-Acting Injectable Antipsychotics and Oral Antipsychotics With Disease Relapse, Health Care Use, and Adverse Events Among People With Schizophrenia. **JAMA Netw Open**, 5, n. 7, p. e2224163, Jul 1 2022.

ZHANG, C.; FANG, X.; YAO, P.; MAO, Y. *et al.* Metabolic adverse effects of olanzapine on cognitive dysfunction: A possible relationship between BDNF and TNF-alpha. **Psychoneuroendocrinology**, 81, p. 138-143, Jul 2017.

ZHANG, P.; HUANG, J.; GOU, M.; ZHOU, Y. *et al.* Kynurenine metabolism and metabolic syndrome in patients with schizophrenia. **J Psychiatr Res**, 139, p. 54-61, Jul 2021.

ZINCIR, S.; ZINCIR, S. B.; DORUK, A.; ERDEM, M. *et al.* Asymmetric dimethylarginine (ADMA) and treatment response relationship in male patients with first-episode schizophrenia: a controlled study. **Psychiatry Res**, 220, n. 1-2, p. 76-80, Dec 15 2014.

ZOROGLU, S. S.; HERKEN, H.; YUREKLI, M.; UZ, E. *et al.* The possible pathophysiological role of plasma nitric oxide and adrenomedullin in schizophrenia. **J Psychiatr Res**, 36, n. 5, p. 309-315, Sep-Oct 2002.

ZOUPA, E.; PITSIKAS, N. The Nitric Oxide (NO) Donor Sodium Nitroprusside (SNP) and Its Potential for the Schizophrenia Therapy: Lights and Shadows. **Molecules**, 26, n. 11, May 26 2021.

9. ANEXO

Title page

Study *in vitro* of the endothelium-dependent vasodilatation induced by olanzapine

Short running title: Olanzapine endothelium-dependent vasodilatation

Authors:

Marelaine Prandi. Department of Surgery and Anatomy. Ribeirao Preto Medical School, University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, Sao Paulo, Brazil.

Jéssyca Michelin Barbosa, M.Sc., Department of Surgery and Anatomy. Ribeirao Preto Medical School, University of Sao Paulo, Ribeirão Preto, Sao Paulo, Brazil.

Agnes A.S. Albuquerque, PhD, Department of Surgery and Anatomy. Ribeirao Preto Medical School, University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, Sao Paulo, Brazil.

Andrea Carla Celotto, PhD, Faculty of Health Sciences of Barretos Dr. Paulo Prata, Barretos, Sao Paulo, Brazil

Paulo Roberto B. Evora, MD, PhD, Department of Surgery and Anatomy. Ribeirao Preto Medical School, University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, Sao Paulo, Brazil

Corresponding author: Paulo Roberto B. Evora. Address: Bandeirantes Avenue, 3900, zip code: 14049-900, Ribeirão Preto—São Paulo – Brazil. Phone: +551639636631. Email: prbevora@fmrp.usp.br.

No financial support.

Abstract

Objective. The present investigation was carried out to understand and evaluate the mechanisms involved in the action of the atypical anti-psychotic olanzapine on endothelial function, and association with endothelial dysfunctions.

Method. The experimental animals were male Wistar Hannover rats with a mean age of 70–90 days. The endothelium-dependent vascular reactivity was studied by measuring the isometric force and constructing olanzapine concentration-response curves, in the aorta rings with and without the endothelium, and incubation for 30 min in "organ chambers" with different inhibitors: L-Name; ODQ; indomethacin; tetraethylammonium and potassium chloride.

Results. Olanzapine induced relaxation in aortic rings with endothelium pre-contracted with phenylephrine but did not change the tension of rings without endothelium. In aortic rings with endothelium, L-Name, ODQ, the association of L-Name and indomethacin, TEA and KCl blocked olanzapine-induced relaxation, whereas indomethacin did not.

Conclusion. Considering the results found in the present study on olanzapine and the results previously demonstrated by the clozapine group, we can infer that antipsychotics would not be responsible for the increased occurrence of cardiovascular diseases in treated schizophrenic patients, regarding the effect of this class of drugs on the vasculature. However, the antipsychotic-induced metabolic profile was not considered in this study.

Keywords, Schizophrenia. Cardiovascular diseases. Antipsychotic. Olanzapine. Vascular reactivity.

Introduction

Schizophrenia is a global problem that affects individuals, families and societies and is listed among the top 20 global causes of disease, often considered a multifactorial disease^{1,2}. It is a debilitating and chronic psychiatric disorder, which can cause social and occupational disability^{3,4}.

Although it is well recognized that individuals with this disorder die prematurely compared to the general population (2 to 3 times greater chance of death), the reasons for the difference in estimated life expectancy of 15 to 20 years are unclear, but some authors cite a relationship with unnatural death, including suicides, accidents, violence, and substance abuse. A considerable number of patients die from natural causes such as cardiovascular disease (CVD), cancer, diabetes, and lung diseases⁵⁻⁹.

Population studies, including twin and family studies, show that schizophrenia is highly heritable and involves the synergistic interaction of multiple genes and environmental factors¹⁰. According to some authors, this disease, with a strong genetic component, has a heritability of approximately 80 to 85%^{5,6,11}.

This psychiatric disorder is commonly treated with antipsychotics, which helps both in the acute psychotic state and in the illness's maintenance, preventing relapses. However, they have many extremely unpleasant and costly side effects, such as the occurrence of emotional numbness, movement disorders and functional disorders of various organs, which can lead to the development of metabolic syndrome, diabetes, and CVD^{7,12-14}.

Currently, antipsychotics are called typical and atypical tranquilizers. Typical are classified as first generation (FGA) and atypical as second generation (SGA)¹⁵.

In recent years, the most used antipsychotics are SGA, such as olanzapine, which has fewer extrapyramidal side effects and has a greater effect on negative symptoms of schizophrenia, but is associated with dyslipidemia, hyperglycemia and overweight, which increase the incidence of CVD^{16,17}.

Few antipsychotics drugs have been therapeutically effective as olanzapine, but it can deregulate hepatic lipid metabolism, promote hyperlipidemia, and worsen aortic inflammation, accelerating the development of

atherosclerosis and increasing CVD risks, responsible for higher mortality in patients with schizophrenia^{18, 19}.

There is a clear association between the use of antipsychotic drugs and CVD, studies on the direct effect of antipsychotic drugs on vascular endothelial function are practically non-existent²⁰.

Thus, this study evaluated the mechanisms involved in endothelium-dependent vascular reactivity under the action of olanzapine, since the research group already presents results on the effects of clozapine on vascular reactivity. Such drugs are widely used and evaluated in several clinical studies under different aspects, but not in relation to their direct effect on the vessel.

Materials and methods

Animals

Male Hannover rats, with an average age of 70-90 days (250 to 300 g), from the Central Animal House of the Ribeirão Preto Campus, University of São Paulo (USP) were used. The animals were placed in an environment with controlled temperature (22 - 25°C) and light/dark cycle (12/12 hours). Water and food were free for the animals. The procedures with the animals, as well as the experimental protocols of this study, were approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation of the Ribeirão Preto Medical School (CEUA-FMRP), under protocol number 048/2020.), and the protocols follow the Guide for Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (NIH Publication n. 85–23, revised 1996).

Study of vascular reactivity in organ chambers

The rats were anesthetized with urethane (40 mg/kg, intraperitoneal) and exsanguinated by an abdominal puncture of the aorta. Then, the thoracic aorta was carefully removed, placed on a Petri dish filed with Krebs solution, and cut into 4-mm long segments. The rings were placed immediately in an organ chamber filed with 10 ml of Krebs solution with the following composition (listed in mM): NaCl 118.3; KCl 4.7; MgSO₄ 1.2; KH₂PO₄ 1.22; CaCl₂ 2.5; NaHCO₃ 25.0 e C₆H₁₂O₆ 11.1; pH 7,4.

The vessels were kept at 37 °C and continuously gassed with a carbogenic mixture (95% O₂ and 5% CO₂). The tension was measured isometrically with a force transducer (Grass force-displacement transducer FT03, Grass Instrument CO, Quincy, MA, USA) connected to a data acquisition system (Gould, Cleveland, OH, USA). The rings were gradually stretched to a basal tension of 1.0 g and then allowed to equilibrate for 60 min. In some preparations, the endothelium was mechanically removed by gently rolling the lumen of the vessel on a thin wire. Endothelial integrity was assessed qualitatively by relaxation caused by acetylcholine (Ach) (10⁻⁸ M).

Dose-response curves in rings pre-contracted with phenylephrine (PE) (10⁻⁷ M) were performed for the antipsychotic drug olanzapine between 10⁻¹⁰ M to 10⁻⁶ M, in the presence and absence of inhibitors, the which were incubated, alone or in association, for 30 minutes.

Experiments were conducted in the presence and absence of Indomethacin (10⁻⁵ M, which is a non-selective cyclooxygenase (COX) inhibitor), and to evaluate the NO/cGMP, N^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-Name) (10⁻⁴ M), which is a non-selective nitric oxide synthase (NOS) inhibitor. Additionally, 1H- [1,2,4] Oxadiazolo [4,3-a] quinoxalin-1-one (ODQ) (10⁻⁵ M) which is a soluble guanylyl cyclase (sGC) inhibitor, was assayed to investigate pathway involvement. To study the participation of potassium channels (K⁺) we used tetraethylammonium (TEA) (10⁻⁶ M) as a non-selective potassium channel blocker, and pre-contraction with potassium chloride (KCl) (10⁻⁶ M).

Data analysis

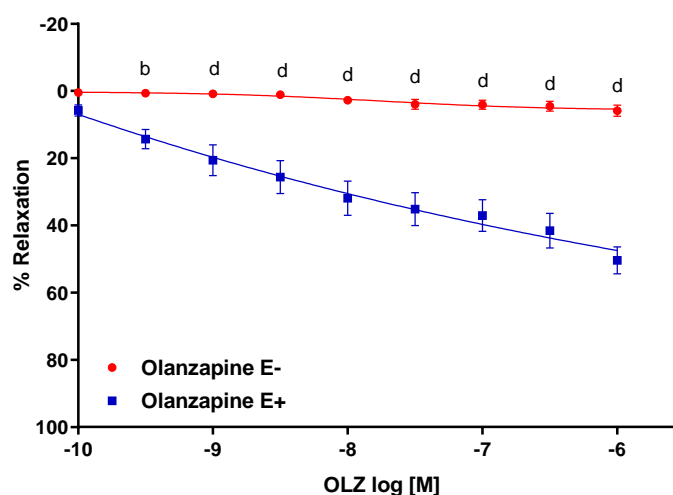
Data were presented as mean ± standard error of the mean (SEM) and were compared by one-way analysis of variance (two-way ANOVA), followed by the Bonferroni post-test, using the GraphPad Prism program version 8.0 (GraphPad Software Corporation, La Jolla, California, USA). The significance level adopted was $p \leq 0.05$.

Results

Effects of olanzapine on aorta rings under basal tension and pre contracted with PE

Olanzapine promoted dose-dependent relaxation in rings with endothelium (E+), and not in rings without endothelium (E-), pre-contracted with PE (Figure 1). This experimental finding shows that the reactivity of the thoracic aorta is endothelium dependent. With this result, a protocol was determined to evaluate the mechanisms related to endothelium-dependent relaxation.

Figure 1. Dose-response curve for olanzapine in rat aortic rings, with and without endothelium, pre-contracted with PE (10^{-7} M). Data represent mean \pm SEM (n=8), two-way ANOVA, Bonferroni post-test (b: $p < 0.01$; d: $p < 0.0001$).



Participation of PGI2 and NO in olanzapine-induced relaxation in aortic rings pre-contracted with PE

Olanzapine promoted dose and endothelium-dependent relaxation, even in the presence of the prostanoid synthesis inhibitor, excluding the participation of PGI2 (Figure 3). However, L-Name and the association of L-Name with indomethacin reduced olanzapine-induced relaxation, so that relaxation after NOS inhibition was like that of rings without endothelium. (Figures 2 and 4). Blocking ODC-induced relaxation further reinforces the role of the NO/cGMP pathway in olanzapine-induced relaxation (Figure 5).

These results demonstrate that nitric oxide (NO) endothelial was possibly responsible for the potentiation of relaxation in the presence of endothelium, with no participation of prostanoids, since the reduction in relaxation observed after

incubation with L-Name did not differ from that observed when L-Name was associated with indomethacin.

Figure 2. Dose-response curve for olanzapine in rat aortic rings, with endothelium, pre-contracted with PE (10^{-7} M) in the absence and presence of L-Name (10^{-4} M). Data represent mean \pm SEM (n=8), two-way ANOVA, Bonferroni post-test (b: $p < 0.01$; c: $p < 0.001$; d: $p < 0.0001$).

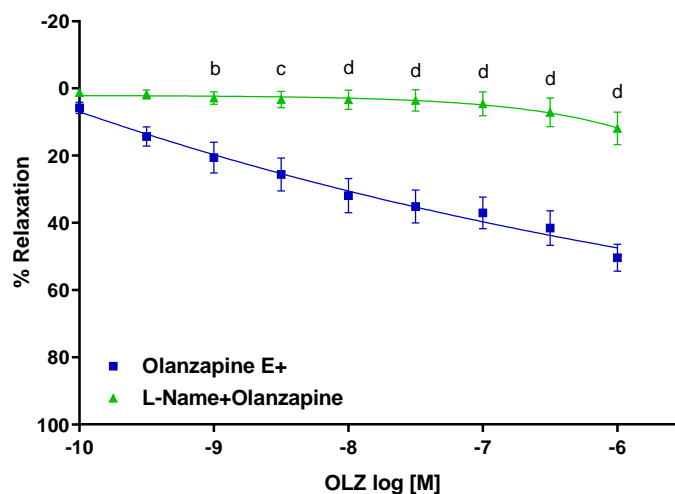


Figure 3. Dose-response curve for olanzapine in rat aortic rings, with endothelium, pre-contracted with PE (10^{-7} M) in the absence and presence of Indomethacin (10^{-5} M). Data represent mean \pm SEM (n=8), two-way ANOVA, Bonferroni post-test.

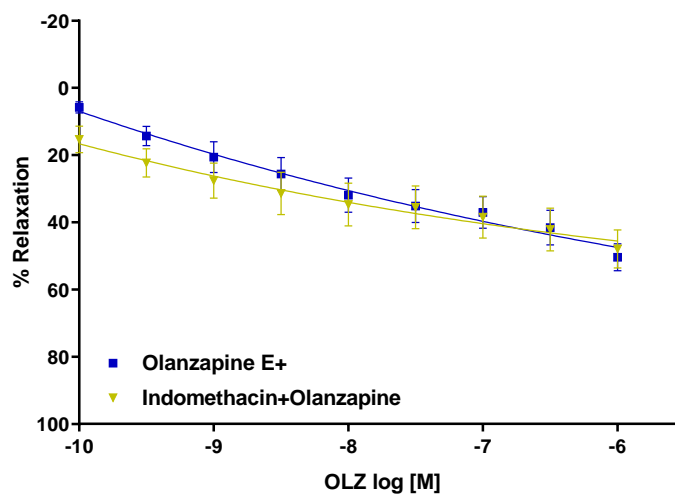


Figure 4. Dose-response curve for olanzapine in rat aortic rings, with endothelium, pre-contracted with PE (10^{-7} M) in the absence and presence of the association of L-Name (10^{-4} M) and indomethacin (10^{-5} M). Data represent mean \pm SEM (n=8), two-way ANOVA, Bonferroni post-test (a: $p < 0.05$; c: $p < 0.001$; d: $p < 0.0001$).

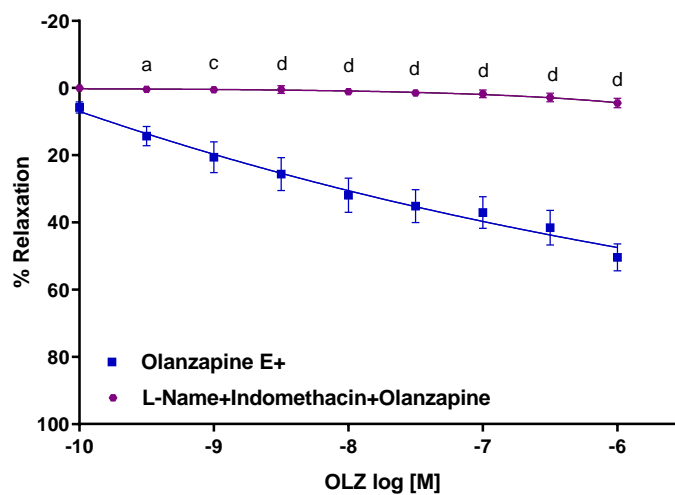
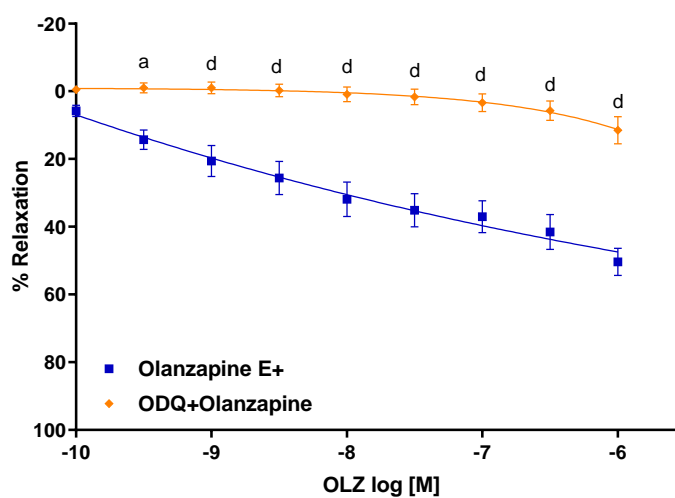


Figure 5. Dose-response curve for olanzapine in rat aortic rings, with endothelium, pre-contracted with PE (10^{-7} M) in the absence and presence of ODQ (10^{-2} M). Data represent mean \pm SEM (n=8), two-way ANOVA, Bonferroni post-test (a: $p < 0.05$; d: $p < 0.0001$).



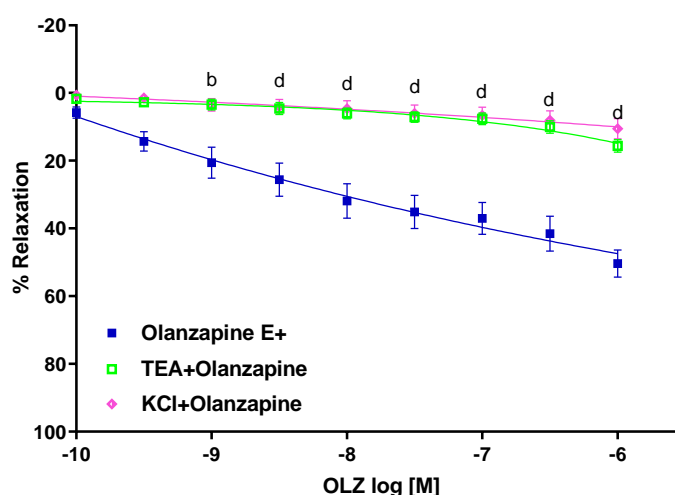
Participation of K⁺ channels in olanzapine-induced relaxation in aortic rings pre-contracted with PE

To investigate whether potassium could play a role in olanzapine-induced relaxation, TEA, and high concentrations of KCl were used to block all potassium channels.

In rings with endothelium, both TEA and KCl blocked olanzapine-induced relaxation, revealing the participation of potassium channels in this vasodilatory response (Figures 6).

Considering that the reduction in relaxation by TEA and KCl was the same observed by L-Name and ODQ, it is likely that these pathways intersect and, from there, lead to a common factor for inducing relaxation.

Figure 6. Dose-response curve for olanzapine in rat aortic rings, with endothelium, pre-contracted with PE (10^{-7} M) in the absence and presence of TEA (1M) and KCl (90 mM). Data represent mean \pm SEM (n=8), two-way ANOVA, Bonferroni post-test (b: $p < 0.01$; d: $p < 0.0001$).



Discussion

Schizophrenia is associated with an increase in morbidity and mortality, mainly because of cardiovascular disorders. The causes for this association are believed to be inadequate somatic care, an unhealthy lifestyle, and the side effects of the most used antipsychotic agents, atypical antipsychotics, which can cause weight gain and metabolic syndrome.

These factors probably converge to the induction of pathophysiological pathways in the cardiovascular system underlying the development of CVD, such as endothelial dysfunction. In a study of antipsychotic-treated schizophrenic patients, 48% of subjects met criteria for endothelial dysfunction from assessments performed by peripheral artery tonometry ²¹. Thus, endothelial dysfunction is a possible cellular phenomenon associated with schizophrenia, antipsychotic use, and cardiovascular mortality. Corroborating these findings, Ellingrod et al (2011), also showed that 50% of individuals with schizophrenia meet the criteria for endothelial dysfunction, assessed with peripheral artery tonometry ²². The authors also report that at least 40% of the schizophrenic individuals evaluated also meet the criteria for metabolic syndrome. Regarding the use of antipsychotics, it was found that the positive impact on the endothelium of a diet rich in omega-3 was no longer observed in patients using antipsychotics.

The results presented in the literature, so far, show that there is no consistent data on the real impact of schizophrenia on vascular function, on CVD, and even less on what would be the impact of treatment with antipsychotics. In recent years, efforts have been made to unravel the association between the use of antipsychotics and the occurrence of CVD.

The endothelium is a vital organ that has received important attention because of its relationship with CVD. It is composed of a single layer of cells that line all blood vessels and represents an important organ for its effects on regulating vasomotor tone, thrombosis, inflammation, platelet and leukocyte adhesion, and vascular permeability. The ability to measure endothelial functioning can help predict an individual's risk of developing CVD. Such measurements are possible from fingertip pulse amplitude tonometry analysis, a non-invasive method to measure endothelium-dependent vasodilation of small vessels (arteriole), and to determine vascular health within the outpatient clinical setting ^{23, 24}. Associated with this technology are also endogenous markers of endothelial dysfunction, such as asymmetric dimethyl arginine (ADMA).

ADMA, an endogenous NOS inhibitor, and the L-arginine/ADMA ratio are markers of endothelial dysfunction that predict mortality and adverse outcome in a series of CVDs. Increased ADMA levels may also be associated with the occurrence of oxidative stress.

Plasma ADMA levels were investigated in three studies with schizophrenic patients. Das et al. (1996), showed that plasma ADMA was elevated in some patients during the first episode of the disease and that, therefore, they were not using antipsychotics²⁵. Celik et al. (2011), demonstrated that plasma ADMA levels were increased in patients with schizophrenia both in the first episode and after multiple episodes of the illness. ADMA was not correlated with symptomatology but was higher in patients with multiples versus first-episode patients²⁶. Zincir et al. (2014), showed that plasma ADMA was 3-fold higher in patients with first-episode schizophrenia compared with healthy controls, and that these patients had a 50% reduction in ADMA after two months of antipsychotic treatment²⁷.

Contradicting previous results, Jorgensen et al. (2015), did not find any change in plasma ADMA levels in schizophrenic and antipsychotic-treated patients²⁸. Considering the findings of Zincir et al. (2014), this disparity in results could be attributed to the antipsychotic treatment itself, since the drugs could reduce ADMA²⁷.

Considering the importance of endothelial function in the development of CVD, its increased prevalence in schizophrenia and the contribution or not of antipsychotics to this context, the results found in the present study become of great importance when associated with findings from evaluations, in vivo not invasiveness, endothelial dysfunction, and the analysis of plasma biomarkers of endothelial function.

In the present study, isolated vessel techniques were used. In this way, the influences of local control mechanisms (such as shear stress) and neurohumoral tone were eliminated, ensuring that the vascular responses observed could be specifically attributed to the direct effect of olanzapine on the vessel. However, it is important to point out that under physiological conditions, all tonus control mechanisms could interact, resulting in a vascular response different from that observed in this study. Therefore, the study was carried out in vitro does not allow us to extrapolate the results, deliberately, to what happens in the patient's body when receiving such medication. Such data, associated with those existing in the literature, are important to open new perspectives regarding the effect of antipsychotics on the vasculature and to differ from them from the metabolic effects of these drugs.

The present work showed that olanzapine did not alter the tone of rings without endothelium, pre-contracted with PE. However, it induced dose-dependent relaxation in rings with endothelium, also pre-contracted with PE. It was also observed that olanzapine-induced relaxation was mediated by the activation of the NO/cGMP pathway and potassium channels, but not by prostanoids.

The results observed in the present study show the massive importance of the NO/cGMP pathway in olanzapine-induced relaxation, a result that differs from that found by Mateus et al. (2019), using clozapine. The authors showed that although there is a small participation of the NO/cGMP and PGI₂/cAMP pathways, the clozapine-induced relaxation was partially endothelium-dependent and predominantly mediated by ATP-sensitive potassium channels (K_{ATP}). Considering the diversity of receptors for which antipsychotics have an affinity, it is justifiable to observe differences in the mechanisms of action involved in relaxation ²⁰.

Olanzapine-induced relaxation was blocked to the same extent by L-Name, ODQ, high concentrations of KCl and TEA. Such findings suggest that relaxation could be mediated by a single signaling pathway and that the inhibitors used in the study would block at different points in this pathway.

Considering that the production of NO, in the endothelial cell, starts with the stimulus of a receptor linked to G proteins, and that from there a cascade of second messengers is activated (PLC, IP₃, calcium, calmodulin) until culminating in the activation of NOS, L-Name would block this signaling pathway early on. Once produced, NO diffuses to vascular smooth muscle cells, where it binds to GCs, activating it and increasing cGMP formation ²⁹⁻³¹. At this point in the pathway, the block was performed by the ODQ on the GC. When analyzing the curves presented using L-Name and ODQ, we can see that the magnitude of inhibition was the same.

The continuity of this pathway depends on the reduction in intracellular concentration of calcium ([Ca²⁺]_i) and inhibition of myosin phosphorylation leading to relaxation ²⁹⁻³¹. The GMP produced blocks voltage gated Ca²⁺ channels present in the cell membrane and activates PKG, which phosphorylate reticulum proteins, including phospholamban, responsible for activating the

sarcoplasmic reticulum ATPase that sequesters Ca^{2+} into the reticulum sarcoplasm^{29, 31}.

PKG, produced from the activation of GC/cGMP, besides the actions, also phosphorylate the high-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels, increasing K^+ efflux and promoting relaxation^{30, 31}. Using TEA and high concentrations of KCl can non-specifically block the various potassium channels, the use of these inhibitors led to a blockage of relaxation towards the end of the signaling pathway, where potassium channels have important participation. Furthermore, NO can also directly activate large conductance calcium-activated potassium channels (BK_{Ca}), L-Name itself, through NO reduction, could block these potassium channels.

Using the different inhibitors employed in the present study allowed us to trace, the signaling pathway involved in olanzapine-induced relaxation. Knowing these mechanisms allows for more precise interventions when necessary.

Considering the results found in the present study on olanzapine and the results previously demonstrated by the group on clozapine, we could infer that antipsychotics would not be responsible for the increase in the occurrence of cardiovascular diseases in treated schizophrenic patients, regarding the effect of this class of drugs on the vasculature. However, the antipsychotic-induced metabolic profile was not considered in this study.

Acknowledgments None

Conflicts of interest - None

References

1. Nasyrova RF, Ivashchenko DV, Ivanov MV, Neznanov NG. Role of nitric oxide and related molecules in schizophrenia pathogenesis: biochemical, genetic and clinical aspects. *Front Physiol.* 2015;6:139.
2. Wei Y, Yan VKC, Kang W, Wong ICK, Castle DJ, Gao L, et al. Association of Long-Acting Injectable Antipsychotics and Oral Antipsychotics With Disease Relapse, Health Care Use, and Adverse Events Among People With Schizophrenia. *JAMA Netw Open.* 2022;5:e2224163.
3. Sharma T, Hughes C, Soni W, Kumari V. Cognitive effects of olanzapine and clozapine treatment in chronic schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl).* 2003;169:398-403.
4. Zhang C, Fang X, Yao P, Mao Y, Cai J, Zhang Y, et al. Metabolic adverse effects of olanzapine on cognitive dysfunction: A possible relationship between BDNF and TNF- α . *Psychoneuroendocrinology.* 2017;81:138-43.

5. Zhang P, Huang J, Gou M, Zhou Y, Tong J, Fan F, et al. Kynurenine metabolism and metabolic syndrome in patients with schizophrenia. *J Psychiatr Res.* 2021;139:54-61.
6. Cao H, Meng Y, Li X, Ma X, Deng W, Guo W, et al. The metabolic effects of antipsychotics in the early stage of treatment in first-episode patients with schizophrenia: A real-world study in a naturalistic setting. *J Psychiatr Res.* 2020;129:265-71.
7. Correll CU, Solmi M, Croatto G, Schneider LK, Rohani-Montez SC, Fairley L, et al. Mortality in people with schizophrenia: a systematic review and meta-analysis of relative risk and aggravating or attenuating factors. *World Psychiatry.* 2022;21:248-71.
8. Chen Y, Zhang F, Yan Y, Wang S, Zhang L, Yan F. Sudden Cardiac Death in Schizophrenia During Hospitalization: An Autopsy-Based Study. *Front Psychiatry.* 2022;13:933025.
9. Gundugurti PR, Bhattacharyya R, Koneru A. Management of Psychiatric Disorders in Patients with Cardiovascular Diseases. *Indian J Psychiatry.* 2022;64:S355-S65.
10. Perez-Costas E, Melendez-Ferro M, Roberts RC. Basal ganglia pathology in schizophrenia: dopamine connections and anomalies. *J Neurochem.* 2010;113:287-302.
11. Brennand KJ, Simone A, Jou J, Gelboin-Burkhart C, Tran N, Sangar S, et al. Modelling schizophrenia using human induced pluripotent stem cells. *Nature.* 2011;473:221-5.
12. Berge J, Abri P, Andell P, Movahed P, Ragazan DC. Associations between off-label low-dose olanzapine or quetiapine and cardiometabolic mortality. *J Psychiatr Res.* 2022;149:352-8.
13. Smith J, Griffiths LA, Band M, Hird-Smith R, Williams B, Bold J, et al. Early Intervention in Psychosis: Effectiveness and Implementation of a Combined Exercise and Health Behavior Intervention Within Routine Care. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2020;11:577691.
14. Paderina DZ, Boiko AS, Pozhidaev IV, Mednova IA, Goncharova AA, Bocharova AV, et al. The Gender-Specific Association of DRD2 Polymorphism with Metabolic Syndrome in Patients with Schizophrenia. *Genes (Basel).* 2022;13:
15. Moreira FA, Guimarães FS. Mecanismos de ação dos AntipsicóticosÇ Hipóteses Dopaminérgicas. 2007; 40:63-71.
16. Helio Elkis CG, Henrique Suplicy, Marcos Tambascia, Rodrigo Bressan, Ruy Lyra, Saulo Cavalcante, Walter Minicucci, . Consenso Brasileiro sobre antipsicóticos de segunda geração e distúrbios metabólicos. *Revista Brasileira de Psiquiatria.* 2008;30:77-85.
17. Radu G, Luca C, Petrescu L, Bordejevic DA, Tomescu MC, Andor M, et al. The Predictive Value of Endothelial Inflammatory Markers in the Onset of Schizophrenia. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2020;16:545-55.
18. Lin Y, Peng Y, He S, Xu J, Shi Y, Su Y, et al. Serum IL-1ra, a novel biomarker predicting olanzapine-induced hypercholesterolemia and hyperleptinemia in schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2018;84:71-8.
19. Chen CH, Shyue SK, Hsu CP, Lee TS. Atypical Antipsychotic Drug Olanzapine Deregulates Hepatic Lipid Metabolism and Aortic Inflammation and Aggravates Atherosclerosis. *Cell Physiol Biochem.* 2018;50:1216-29.
20. Mateus LS, Albuquerque AAS, Celotto AC, Evora PRB. In vitro evidence that endothelium-dependent vasodilatation induced by clozapine is mediated by an ATP-sensitive potassium channel. *Pharmacol Rep.* 2019;71:522-7.
21. Burghardt K, Grove T, Ellingrod V. Endothelial nitric oxide synthetase genetic variants, metabolic syndrome and endothelial function in schizophrenia. *J Psychopharmacol.* 2014;28:349-56.
22. Ellingrod VL, Taylor SF, Brook RD, Evans SJ, Zollner SK, Grove TB, et al. Dietary, lifestyle and pharmacogenetic factors associated with arteriole endothelial-dependent vasodilatation in schizophrenia patients treated with atypical antipsychotics (AAPs). *Schizophr Res.* 2011;130:20-6.

23. Bonetti PO, Pumper GM, Higano ST, Holmes DR, Jr., Kuvin JT, Lerman A. Noninvasive identification of patients with early coronary atherosclerosis by assessment of digital reactive hyperemia. *J Am Coll Cardiol.* 2004;44:2137-41.
24. Kuvin JT, Patel AR, Sliney KA, Pandian NG, Sheffy J, Schnall RP, et al. Assessment of peripheral vascular endothelial function with finger arterial pulse wave amplitude. *Am Heart J.* 2003;146:168-74.
25. Das I, Khan NS, Puri BK, Hirsch SR. Elevated endogenous nitric oxide synthase inhibitor in schizophrenic plasma may reflect abnormalities in brain nitric oxide production. *Neurosci Lett.* 1996;215:209-11.
26. Celik C, Cayci T, Ozdemir B, Akgul EO, Zincir S, Balikci A, et al. Plasma asymmetric dimethylarginine (ADMA) concentrations in patients with first and multiple episode schizophrenia. *Psychiatry Res.* 2011;190:177-80.
27. Zincir S, Zincir SB, Doruk A, Erdem M, Celik C, Ak M, et al. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) and treatment response relationship in male patients with first-episode schizophrenia: a controlled study. *Psychiatry Res.* 2014;220:76-80.
28. Jorgensen A, Knorr U, Soendergaard MG, Lykkesfeldt J, Fink-Jensen A, Poulsen HE, et al. Asymmetric dimethylarginine in somatically healthy schizophrenia patients treated with atypical antipsychotics: a case-control study. *BMC Psychiatry.* 2015;15:67.
29. Walford G, Loscalzo J. Nitric oxide in vascular biology. *J Thromb Haemost.* 2003;1:2112-8.
30. Bruckdorfer R. The basics about nitric oxide. *Mol Aspects Med.* 2005;26:3-31.
31. Morgado M, Cairrao E, Santos-Silva AJ, Verde I. Cyclic nucleotide-dependent relaxation pathways in vascular smooth muscle. *Cell Mol Life Sci.* 2012;69:247-66.