UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE NEUROCIÊNCIAS E CIÊNCIAS DO COMPORTAMENTO

TIAGO MORAES GUIMARÃES

**Efeitos da adição do mononitrato de isossorbida, um doador de óxido nítrico, ao
tratamento habitual de pacientes com o diagnóstico de esquizofrenia**

**RIBEIRÃO PRETO
2020**

TIAGO MORAES GUIMARÃES

**Efeitos da adição do mononitrato de isossorbida, um doador de óxido nítrico, ao
tratamento habitual de pacientes com o diagnóstico de esquizofrenia**

Versão Original

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Mental da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Saúde Mental

Orientador: Prof. Dr. Jaime E. C. Hallak

RIBEIRÃO PRETO

2020

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

Guimarães, Tiago Moraes

Efeitos da adição do mononitrato de isossorbida, um doador de óxido nítrico, ao tratamento habitual de pacientes com o diagnóstico de esquizofrenia. Ribeirão Preto, 2020.
77f.

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Saúde Mental.
Orientador: Hallak, Jaime Eduardo Cecilio

1. Mononitrato de isossorbida 2. Esquizofrenia 3. MATRICS
4. ASL 5. Neuroimagem funcional.

Nome: Guimarães, Tiago Moraes

Título: Efeitos da adição do mononitrato de isossorbida, um doador de óxido nítrico, ao tratamento habitual de pacientes com o diagnóstico de esquizofrenia.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Mental da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr.

Assinatura: _____

Instituição:

Julgamento: _____

Prof. Dr.

Assinatura: _____

Instituição:

Julgamento: _____

Prof. Dr.

Assinatura: _____

Instituição:

Julgamento: _____

Prof. Dr.

Assinatura: _____

Instituição:

Julgamento: _____

Aos meus pais, Neuci e Eli
à minha mulher, Mara,
e à minha vindoura filha,
ainda com cinco meses de gestação.

AGRADECIMENTOS

À minha amada mulher Mara Guimarães pela companhia preenchedora nestes oito anos no estado de São Paulo.

Ao meu núcleo familiar: meus pais, Eli e Neuci Guimarães, e meu irmão Davi Moraes Guimarães pelo suporte e apoio incondicional durante toda a minha vida.

À nova extensão da minha família, meus sogros João e Sílvia Crisóstomo pelo apoio, pelo carinho e pela força; aos meus cunhados Marúsia, Marília e Márcio pela amizade e pelo apoio.

Ao meu orientador Prof. Dr. Jaime E. C. Hallak pelos ensinamentos, pelo acolhimento, pela incrível compreensão e pelo bom humor sempre presente. Quantas vezes não fui surpreendido por ideias, conselhos e encorajamentos recebidos a qualquer momento em uma simples mensagem de celular.

À equipe do Laboratório de Psicofarmacologia pela ajuda para a conclusão desta pesquisa,

À equipe do setor de radiologia do HCFMRP-USP por todo o pronto auxílio na organização e na logística do agendamento e da execução das ressonâncias magnéticas.

Aos amigos da Pós-Graduação Juliana Mayumi e Roberto Mascarenhas pela amizade e pelo apoio para a realização desta pesquisa.

Aos voluntários da pesquisa pela dedicada participação no desenvolvimento da Ciência.

À equipe do Programa de Esquizofrenia – PROESQ – da UNIFESP, em especial ao psicólogo Arthur Berberian, pelo treinamento nos testes cognitivos.

À equipe da Física Médica, Prof. Dra. Renata Leoni e Prof. Ícaro de Oliveira, pelo suporte técnico na consecução das neuroimagens.

Ao apoio do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Translacional em Medicina (INCT-CNPq).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

GUIMARÃES, TM. Efeitos da adição do mononitrato de isossorbida, um doador de óxido nítrico, ao tratamento habitual de pacientes com o diagnóstico de esquizofrenia (Tese). São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2020.

INTRODUÇÃO: A esquizofrenia é um transtorno crônico que afeta cerca de 0,7% da população mundial. A base do tratamento da esquizofrenia é a farmacoterapia com antipsicóticos, que são efetivos em reduzir sintomas positivos, porém carecem de impacto clínico nos sintomas negativos e cognitivos. Um estudo de 2013 evidenciou redução nos sintomas positivos, negativos e cognitivos após a administração de nitroprussiato de sódio, um doador de NO, em pacientes com diagnóstico de esquizofrenia. Esta droga está disponível apenas na forma intravenosa e necessita de aplicação por bomba de infusão, com monitoração hemodinâmica. No estudo atual, optou-se, então, por testar outro doador de NO: o mononitrato de isossorbida (MNT), que é uma droga segura, de baixo custo e disponível em via oral. Foi formulada a hipótese de que o MNT seria capaz de reduzir sintomas positivos, negativos e cognitivos na esquizofrenia e de que alterações compatíveis com os efeitos clínicos poderiam ser confirmadas nos exames de neuroimagem funcional. **OBJETIVO:** Avaliar os efeitos, em parâmetros clínicos, cognitivos e de neuroimagem, da adição do MNT ao tratamento de pacientes ambulatoriais com diagnóstico de esquizofrenia e ainda sintomáticos. **MÉTODO:** Ensaio duplo-cego, randomizado, controlado por placebo e cruzado realizado entre março de 2015 e dezembro de 2017 no Laboratório de Psicofarmacologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP). Foram incluídos pacientes com idade entre 18 e 50 anos com diagnóstico de esquizofrenia, pelo menos um item da PANSS positiva ou negativa ≥ 4 , ausência de uso de substâncias psicoativas, exceto nicotina, e ausência de outras condições médicas graves. Foram aplicadas semanalmente a Escala de Avaliação das Síndromes Positiva e Negativa para Esquizofrenia (PANSS), Escala de Efeitos Colaterais (UKU), Escala de Impressão Clínica Global (CGI) e Escala de Avaliação Funcional (GAF). A avaliação cognitiva através da Bateria Cognitiva Consensual MATRICS (MCCB) foi realizada por três vezes. Os pacientes foram submetidos a três exames de neuroimagem funcional com a técnica *Arterial Spin Labeling* (ASL). **RESULTADOS:** Foram avaliados 24 pacientes de ambos os sexos, sendo três do sexo feminino, e em tratamento antipsicótico. A média de idade dos participantes foi de 34,7 anos e o tempo médio de doença

de 14,87 anos. Vinte estavam em uso de clozapina. Na PANSS Total houve redução estatisticamente significativa (Semana 4: $t = 2,05$; $p < 0,05$), assim como na PANSS Positiva (Semana 4: $t = 2,6$; $p < 0,018$), na PANSS Geral (Semana 4: $t = 2,84$; $p < 0,01$), na GAF (Semana 3: $t = -2,45$; $p < 0,024$) e na CGI (. Qui-quadrado = 44,59; $p < 0,01$). A PANSS negativa não pôde ser avaliada estatisticamente. Não foram encontradas diferenças estatísticas na MCCB. Uma avaliação *post hoc* das neuroimagens evidenciou redução na atividade talâmica em um subgrupo mais grave de pacientes. **CONCLUSÃO:** Os achados sugerem que a dose de 50mg de MNT em liberação prolongada administrada pelo período de um mês apresenta efeito positivo em pacientes crônicos, refratários e em uso de clozapina que persistem com sintomas clinicamente significativos apesar do tratamento otimizado.

Palavras-chave: mononitrato de isossorbida, esquizofrenia, MATRICS, MCCB, ASL, neuroimagem funcional.

ABSTRACT

GUIMARÃES, TM. Mononitrate Isosorbide, a nitric oxide donor, as an adjunctive therapy in patients with schizophrenia (Thesis). São Paulo: University of São Paulo, Ribeirão Preto Medical School, 2020.

INTRODUCTION: The cornerstone in the treatment of schizophrenia is the pharmacotherapy antipsychotics, which are effective in reducing positive symptoms but not negative and cognitive symptoms. A 2013 study showed a reduction in positive, negative and cognitive symptoms after administration of sodium nitroprusside, a donor of NO, in patients diagnosed with schizophrenia. This drug is available only as an intravenous and infusion pump application with hemodynamic monitor, making clinical practice more difficult for outpatients. We then chose to test another donor of NO: isosorbide mononitrate (MNT), which is a safe, oral and low-cost drug. **OBJECTIVE:** To analyze the effects in clinical symptoms scales, and in cognitive and neuroimaging tests, of the addition of MNT to the usual treatment of outpatients diagnosed with schizophrenia and still symptomatic. **METHOD:** Double-blind, randomized, placebo-controlled crossover trial was conducted from March 2015 to December 2017 at the Psychopharmacology Laboratory of the Ribeirão Preto Medical School University Hospital of the University of São Paulo (HCFMRP-USP). Positive and Negative Syndromes Scale for Schizophrenia (PANSS), Side Effects Scale (UKU), Global Clinical Impression (CGI) and Global Assessment of Functioning (GAF) were applied weekly, and the cognitive assessment through the MATRICS Consensus Cognitive Battery (MCCB), three times. Patients underwent three functional magnetic resonance imaging exams using the Arterial Spin Labeling (ASL) technique; at the beginning. We hypothesized that MNT would be able to reduce positive, negative and cognitive symptoms in schizophrenia and that changes consistent with clinical effects could be confirmed in functional neuroimaging examinations. **RESULTS:** We evaluated 24 (three female) patients of both sexes, under antipsychotic treatment and followed at HCFMRP-USP. One subject did not complete the study. The average age of the participants was 34.7 years and the average illness time was 14.87 years. Twenty were on clozapine. Statistically significant results were found for all clinical measures. In PANSS total score there was a statistically significant reduction (Week 4: $t = 2.05$; $gl = 29$; $p < 0.05$), as well as in PANSS positive score (Week 4: $t = 2.6$; $p < 0.018$) in PANSS General (Week 4: $t = 2.84$; $p < 0.01$), in GAF (Week 3: $t = -2.45$; $gl = 20$; $p < 0.024$) and in CGI (chi-square = 44.59; $gl = 8$; $p < 0.01$).

PANSS negative score could not be statistically evaluated. No statistical differences were found in the MCCB. A posthoc neuroimaging analysis showed reduction in thalamic activity in a more severe subgroup of patients. **CONCLUSION:** With the exception of the MCCB and of the PANSS negative subscale, antipsychotic-treated patients with schizophrenia with evidence of treatment resistance showed statistically significant improvement in symptoms after four weeks of MNT 50mg/day across all of the measured outcomes.

Keywords: isosorbide mononitrate, schizophrenia, MATRICS, MCCB, ASL, functional neuroimaging.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – PANSS Total: Teste t de amostras pareadas.....	44
Gráfico 2 – PANSS Psicopatologia Geral: Teste t de amostras pareadas.....	44
Gráfico 3 – PANSS Positiva: Teste t de amostras pareadas.....	45
Gráfico 4 – Análise não-paramétrica da CGI.....	46
Gráfico 5 – Análise da GAF: Teste t de amostras pareadas.....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Delineamento do estudo.....	37
Tabela 2 – Características demográficas dos sujeitos.....	41
Tabela 3 – Diferenças sociodemográficas entre os grupos quanto à ordem de início do fármaco/placebo.....	42
Tabela 4 – Diferenças entre os grupos nas escalas psicométricas antes do início do ensaio.....	43
Tabela 5 – Doadores de Óxido Nítrico em pacientes com esquizofrenia: resultados e características de ensaios clínicos randomizados publicados.....	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Herdabilidade na esquizofrenia; metanálise de estudos com gêmeos	18
Figura 2 – Interações entre as vias dopaminérgicas e glutamatérgicas na região mesolímbica....	22
Figura 3 – Métodos de marcação para a aquisição de imagens no ASL.....	28
Figura 4 – Fluxograma conforme o <i>Consolidated Standards of Reporting Trials</i> (<i>CONSORT</i>).....	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

mtALDH: Aldeído Desidrogenase Mitocondrial

cAMP: Monofosfato Cíclico de Adenosina

APQE: Ambulatório de Esquizofrenia

AREP: Ambulatório de Reabilitação Psicossocial

ASL: *Arterial Spin Labeling* (marcação dos spins arteriais)

BOLD: *Blood Oxygen Level Dependency*

BPRS: *Brief Psychiatric Rating Scale* (Escala Psiquiátrica)

CBF: Fluxo Sanguíneo Cerebral

CGI: *Clinical Global Impression* (Escala de Impressão Clínica Global)

CREB: *cAMP response element-binding protein*

DSM-IV-R: *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders—Fourth Edition Revised*

GAF: *Global Assessment of Functioning* (Escala de Avaliação Funcional)

sGC: Guanilato Ciclase Solúvel

GMPc: Monofosfato Cíclico de Guanosina

HCFMRP-USP: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-
Universidade de São Paulo

LTP: *Long-term Potentiation*

MATRICES: *Measurement and Treatment Research to Improve Cognition*

MCCB: *MATRICES Consensus Cognitive Battery* (Bateria Cognitiva Consensual MATRICES)

MNT: Mononitrato de Isossorbida

NIMH: *National Institute for Mental Health*

NMDA: N-Metil-D-Aspartato

NO: Óxido Nítrico

NOS: Óxido Nítrico Sintase

eNOS: Óxido Nítrico Sintase Endotelial

iNOS: Óxido Nítrico Sintase Indutível

nNOS: Óxido Nítrico Sintase Neuronal

NTG: Nitroglicerina, gliceriltrinitrato ou trinitroglicerina

ORN: Nitratos Orgânicos

PANSS: *Positive and Negative Syndromes Scale* (Escala de Avaliação das Síndromes Positiva e Negativa para Esquizofrenia)

PROESQ—UNIFESP—EPM: Programa de Esquizofrenia da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina

PRS: *Psychopathology Rating Scale*

QI: Coeficiente de Inteligência

fRNM: Ressonância Magnética Funcional

ROI: Regiões de Interesse

SCID-IV: *Structured Clinical Interview for DSM-IV* (Entrevista Estruturada para o DSM-IV)

SNAP: S-Nitroso-N-Acetilpenicilamina

SNC: Sistema Nervoso Central

TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

UKU: *Ugvalg for Kliniske Undersgeiser* (Escala de Efeitos Colaterais)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1. ETIOLOGIA	16
1.1.1. Genética	17
1.1.2. Neurodesenvolvimento	19
1.2. MODELOS FISIOPATOLÓGICOS	20
1.3. O SISTEMA NMDA-NO-GMPC E OUTRAS VIAS RELACIONADAS AO ÓXIDO NÍTRICO	22
1.4. DOADORES DE ÓXIDO NÍTRICO	24
1.5. NITROPRUSSIATO DE SÓDIO	25
1.6. MONONITRATO DE ISOSSORBIDA	26
1.7. NEUROIMAGEM FUNCIONAL	27
2. OBJETIVOS	30
2.1. OBJETIVO GERAL	30
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1. SUJEITOS	31
3.2. INSTRUMENTOS DE AVALIAÇÃO	32
3.3. DROGAS	34
3.4. PROCEDIMENTO	35
3.5. ANÁLISE DOS RESULTADOS	37
3.6. ANÁLISE DOS DADOS CLÍNICOS E DEMOGRÁFICOS	38
3.7. ANÁLISE DAS IMAGENS	38
4. RESULTADOS	40
4.1. ESCALA DE AVALIAÇÃO DAS SÍNDROMES POSITIVA E NEGATIVA PARA ESQUIZOFRENIA	42
4.1.1. Escore Total da PANSS	43
4.1.2. Escore de Psicopatologia Geral da PANSS	43
4.1.3. Escore de Sintomas Positivos da PANSS	45
4.1.4. Escore de Sintomas Negativos da PANSS	45
4.2. ESCALA DE IMPRESSÃO CLÍNICA GLOBAL	46
4.3. ESCALA DE AVALIAÇÃO FUNCIONAL	46
4.4. BATERIA COGNITIVA CONSENSUAL MATRICS	47
4.5. NEUROIMAGEM FUNCIONAL	48
4.6. SEGURANÇA	48

5. DISCUSSÃO.....	49
6. LIMITAÇÕES.....	55
7. CONCLUSÕES.....	56
REFERÊNCIAS	57
APÊNDICES	
APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	67
ANEXOS	
ANEXO A – Escala das Síndromes Positiva e Negativa – PANSS.....	71
ANEXO B – Página inicial da Bateria Cognitiva Consensual MATRICS.....	73
ANEXO C – Escala UKU de Efeitos Colaterais.....	74
ANEXO D – Parecer Consubstanciado — CEP.....	76

1. INTRODUÇÃO

A esquizofrenia é um transtorno psiquiátrico grave e que causa impacto em múltiplas dimensões na vida do paciente acometido. Indivíduos com esquizofrenia têm de 13 a 15 anos potenciais de vida perdidos. A expectativa de vida é de 68 anos para mulheres e de 60 anos para homens diagnosticados com o transtorno (HJORTHØJ et al., 2017). Essa condição médica está entre as dez causas mundiais de incapacidade ajustada por anos de vida e, apesar dos avanços clínicos e científicos, continua sendo um desafio etiológico, diagnóstico e terapêutico (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2001). É um transtorno crônico, incapacitante e com uma prevalência de 0,7% durante a vida (MCGRATH et al., 2008). O primeiro episódio psicótico ocorre, principalmente, entre o final da adolescência e o início da vida adulta (PANARIELLO et al., 2010) e causa prejuízo significativo no funcionamento individual, social e ocupacional (KOOYMAN et al., 2007); o que acarreta em altos custos ao setor socioeconômico e aos sistemas de saúde (CLOUTIER et al., 2016).

A apresentação clínica desse transtorno psiquiátrico é heterogênea e sua psicopatologia pode se expressar de diferentes formas entre os pacientes e também ao longo do curso do transtorno (TANDON; NASRALLAH; KESHAVAN, 2009). Em termos clínicos, a esquizofrenia pode ser dividida em três dimensões ou síndromes principais: síndrome positiva (delírios, alucinações, desorganização), síndrome cognitiva (prejuízo nas funções executivas, memória e atenção) e síndrome negativa (embotamento afetivo, avolia, anedonia, isolamento social e alogia). Porém, ainda há controvérsia na literatura em relação às dimensões sintomatológicas da esquizofrenia e, a depender do enfoque, outras dimensões são consideradas, como a afetiva e a de desorganização (sintomas depressivos, sintomas maníacos, discurso desorganizado, comportamento desorganizado) (PERALTA; CUESTA, 2001).

1.1. ETIOLOGIA

Os achados acumulados nas últimas décadas sugerem que o transtorno seja o resultado da interação de fatores genéticos e ambientais, e que não existe alteração única e específica (MUESER; MCGURK, 2004).

1.1.1. Genética

A análise de parentes ou familiares de casos índice é a forma mais antiga de demonstrar a carga genética de uma doença. Excluindo-se a influência ambiental e considerando-se que os indivíduos de parentesco próximo apresentam um risco aumentado da morbidade estudada, pode-se inferir que a chance aumentada se deve a fatores herdados.

Em 1916, foi conduzido o primeiro trabalho sistematizado sobre a herança familiar na esquizofrenia. O pesquisador Ernst Rüdin, seguindo os critérios diagnósticos de Emil Kraepelin e aplicando procedimentos simples de cegamento nas avaliações, chegou à conclusão de que há transmissão genética na esquizofrenia (ZERBIN-RÜDIN; KENDLER, 1996).

Pesquisas do início do século XXI confirmam os achados do início do século passado. Um risco de 39,2% nos filhos em que ambos os pais têm diagnóstico de esquizofrenia foi encontrado em metanálise realizada na Dinamarca (GOTTESMAN et al., 2010). Em Taiwan, onde a prevalência da esquizofrenia é de apenas 0,27%, o risco em parentes de primeiro grau é de 3,9%. Na África do Sul, foi encontrado um risco de 10,9% em estudo semelhante ao de Taiwan.

Em metanálise que incluiu 12 estudos com gêmeos foram encontrados herdabilidade de 81% (IC=95%, 73–90%) e influência ambiental de 11% (IC=95%, 13–19%) (SULLIVAN; KENDLER; NEALE, 2003) (Figura 1). Os resultados apontam para a mesma direção em estudos de adoção. A prevalência de esquizofrenia em filhos adotados por pais saudáveis, porém com pais biológicos afetados pelo transtorno, é de aproximadamente 10% (LICHTENSTEIN et al., 2009; TIENARI et al., 2003).

Somam-se aos estudos de herança familiar, as investigações de genes, de alelos, de bases nitrogenadas e de expressão proteica. Os estudos de *Genome-Wide Association* (GWAS) rastreiam em todo o genoma alelos comuns que apresentam variação, conhecidos como *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNP), para determinar se esses alelos variantes estão associados a alguma característica específica investigada. Amostras de dezenas de milhares ou centenas de milhares de indivíduos são necessárias para atingir significância estatística devido ao diminuto tamanho de efeito representado por cada alelo implicado e ao alvo do intervalo de confiança, que em muitos desses estudos é de $P < 5 \times 10^{-8}$.

Um trabalho de GWAS publicado pelo *Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomic Consortium* incluiu 36.989 casos e 113.075 controles; foram encontradas 108 regiões (*loci*) com SNPs especificamente relacionados à esquizofrenia. Cerca de 75% dos

polimorfismos estavam intimamente associados aos receptores de dopamina tipo 2 (D2R), à transmissão glutamatérgica e à plasticidade sináptica (BRAMON et al., 2014).

Figura 1 – Herdabilidade na esquizofrenia; metanálise de estudos com gêmeos

As barras representam a variância genética cumulativa em cada estudo. A última barra representa a síntese quantitativa (SULLIVAN; KENDLER; NEALE, 2003).

Outro tipo de investigação envolve as *Copy Number Variants* (CNVs), que são deleções ou duplicações em regiões cromossômicas de pelo menos 1 *kilobit* (kb) de bases nitrogenadas. Um exemplo clássico e relevante de CNV é o da região 22q11.2 do cromossomo 22. Esta consiste em uma deleção de 2,5 megabits que é causa de uma doença congênita denominada de Síndrome Velo-cardio-facial ou Síndrome de DiGeorge ou Síndrome de Shprintzen. A chance de desenvolver esquizofrenia ou outras síndromes psicóticas crônicas é de 30% nos indivíduos acometidos. Em estudo conduzido pelo *Psychiatric Genomics Consortium CNV Analysis Group* foram encontrados 8 CNVs de risco, entre eles o 22q11.2, todos relacionados à funções

sinápticas como as de adesão celular, proteínas de arcabouço e receptores glutamatérgicos ionotrópicos. Em conjunto, CNVs e SNPs explicam apenas 5% dos casos de esquizofrenia, contudo, quando um indivíduo apresenta algumas dessas alterações, o risco de desenvolver o transtorno pode chegar a 90% (MARSHALL et al., 2017).

As plataformas de genotipagem para detecção de SNPs e CNVs são as mesmas, contudo elas são incapazes de detectar mutações raras ou *de novo*, denominadas *Single Nucleotide Variants* e *indels* (pequenas inserções ou deleções). Para isso, a técnica de sequenciamento de exoma é utilizada. Em grandes sequenciamentos realizados em pacientes com esquizofrenia, foram encontradas mutações raras associadas aos canais de cálcio, ao complexo ou densidade pós-sináptica e aos receptores de glutamato do tipo N-Metil-D-Aspartato (NMDA) (FROMER et al., 2014; PURCELL et al., 2014).

1.1.2. Neurodesenvolvimento

Nas últimas três décadas, foram encontradas evidências de que a esquizofrenia é um transtorno do neurodesenvolvimento (LEWIS; LEVITT, 2002; PILOWSKY; KERWIN; MURRAY, 1993; WADDINGTON, 1993). Uma das anormalidades chave ocorreria durante os estágios finais do desenvolvimento cerebral, em torno dos 20 anos de idade, quando o organismo passa por uma revisão das conexões sinápticas e apresenta seu crescimento final (MACDONALD et al., 2017; WEINBERGER, 1987, 1996).

Uma abordagem metodológica recente tenta diferenciar o impacto de genes específicos em diferentes fases do desenvolvimento. Alguns dos genes relacionados à esquizofrenia, como os encontrados nos estudos genéticos, apresentam expressão aumentada no período fetal, o que aponta, também, para alterações no neurodesenvolvimento precoce (BIRNBAUM et al., 2014).

A influência dos fatores ambientais no neurodesenvolvimento é difícil de isolar; existem evidências indiretas de que complicações gestacionais e perinatais como prematuridade, pré-eclâmpsia, infecção intrauterina e incompatibilidade imunológica materno-fetal aumentam o risco de esquizofrenia e podem estar relacionadas a fatores epigenéticos (JAFFE et al., 2016; MURRAY et al., 2017).

Um estudo conduzido por URSINI et al. se propôs a avaliar as associações entre adversidade uterinas e perinatais e os escores de risco poligênicos encontrados nos GWAS. Foi encontrada relação positiva bidirecional entre os eventos ambientais precoces e os escores genéticos de risco. Dentre os fatores tardios de risco implicados em alterações do

neurodesenvolvimento estão envolvidos a vida em grandes centros urbanos, migração, abuso físico e sexual, e uso de THC (TANDON; KESHAVAN; NASRALLAH, 2008).

1.2. MODELOS FISIOPATOLÓGICOS

A hipótese dopaminérgica predominou durante muito tempo como a principal explicação moderna para as manifestações clínicas da esquizofrenia. Nela postula-se que os sintomas se devem a uma disfunção do sistema cerebral regulado pelo neurotransmissor dopamina (MELTZER; STAHL, 1976; REYNOLDS, 1983; SEEMAN et al., 1976). O principal alicerce dessa hipótese é a resposta que os pacientes obtêm ao usar antipsicóticos ou neurolépticos, drogas que agem antagonizando os receptores dopaminérgicos tipo 2 (D2R) (JOHNSTONE et al., 1978; REYNOLDS, 1989). Contudo, essa resposta é apenas parcial, apresentando pouco ou nenhum impacto sobre as dimensões negativa e cognitiva e, em muitos casos, sem remissão completa dos sintomas positivos (KIRKPATRICK et al., 2006; LEUCHT et al., 2009; MORTIMER, 1997).

Outro alicerce para a hipótese dopaminérgica é a psicose induzida por anfetaminas, que agem estimulando o aumento da liberação de dopamina no sistema nervoso central (SNC) (KAHLIG et al., 2005; LIANG; RUTLEDGE, 1982; SULZER; RAYPORT, 1990). Entretanto, a síndrome desencadeada pelas anfetaminas se restringe às manifestações de alucinações e delírios, não sendo reproduzidos nem as alterações da forma do pensamento (exteriorizadas pelo discurso desorganizado) e nem os sintomas negativos, que também são característicos da esquizofrenia (BELL, 1965; KRAMER; FISCHMAN; LITTLEFIELD, 1967; LIPSKA; JASKIW; WEINBERGER, 1993).

Há questões que não são explicadas pela teoria dopaminérgica: o que faz com que os sintomas se iniciem na adolescência ou no começo da vida adulta? Como ocorrem as alterações funcionais cerebrais e os prejuízos cognitivos? Por que os antipsicóticos não são igualmente eficazes sobre os sintomas negativos e cognitivos? A partir da observação de que a teoria dopaminérgica não é suficiente para responder essas questões e também porque os antipsicóticos apresentam eficácia parcial, pesquisadores da área passaram a mirar em outros sistemas neuronais que poderiam estar envolvidos com a fisiopatologia da esquizofrenia.

Experimentos sugerem que as anormalidades no sistema dopaminérgico são, na verdade, secundárias a uma alteração em vias neuronais responsáveis pelo seu controle. Portanto, muitos cientistas têm estudado sistemas que regulam o tônus dopaminérgico, tais

como o sistema glutamatérgico, o principal sistema excitatório do SNC e que tem o glutamato como neurotransmissor (MOORE; WEST; GRACE, 1999).

A hipoatividade da via dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA pode estar envolvida na sintomatologia da esquizofrenia. Esses receptores estão localizados em vias neuronais que regulam a liberação de dopamina, sugerindo que a disfunção dopaminérgica encontrada na esquizofrenia poderia estar relacionada a uma disfunção no sistema glutamatérgico (Figura 2). (DEAKIN; SIMPSON, 1997; LINDSLEY et al., 2006). Os receptores NMDA são essenciais para a plasticidade neuronal e para mecanismos de *long term potentiation* (LTP), sinaptogênese e excitotoxicidade (BLISS; COLLINGRIDGE, 1993).

Uma das bases para a hipótese glutamatérgica da esquizofrenia advém da síndrome comportamental induzida por drogas antagonistas dos receptores NMDA, como a fenciclidina e a cetamina. Dentre os modelos farmacológicos utilizados para a indução de sintomas psicóticos, os que usam fármacos antagonistas NMDA são os que mais se aproximam da esquizofrenia, pois, além de sintomas psicóticos, essas drogas induzem sintomas negativos, transtorno da forma do pensamento e déficits cognitivos (LUBY et al., 1959; SIEGEL, 1978; THORNBURG; SAKLAD, 1996; TORU; KURUMAJI; ISHIMARU, 1994).

Reforça essa hipótese a existência de uma encefalite causada por autoanticorpos voltados contra os receptores NMDA, denominada encefalite anti-NMDA, que foi classificada dentro do grupo das encefalites límbicas, doenças conhecidas por causarem alterações comportamentais (DALMAU et al., 2008). O paciente com encefalite anti-NMDA apresenta sintomas que se assemelham ao modelo farmacológico da fenciclidina e da cetamina e à esquizofrenia (DALMAU et al., 2011).

Apesar disso, pesquisas com compostos que estimulam a atividade do receptor NMDA para o tratamento da esquizofrenia não têm produzido resultados positivos (BUCHANAN et al., 2007; TUOMINEN; TIIHONEN; WAHLBECK, 2005). Estudos em animais sugerem que esses achados se devem ao desenvolvimento de uma rápida tolerância a esses compostos, com a migração dos receptores NMDA da membrana celular para o compartimento intracelular (NONG et al., 2003). O uso de fármacos que não atuem diretamente sobre os receptores NMDA, mas que ajam em nível intracelular na cascata após a ativação dos receptores NMDA, poderia evitar esse problema.

Figura 2 – Interações entre as vias dopaminérgicas e glutamatérgicas na região mesolímbica

1.3. O SISTEMA NMDA-NO-GMPC E OUTRAS VIAS RELACIONADAS AO ÓXIDO NÍTRICO

Uma abordagem alternativa ao uso de fármacos que atuem nos receptores NMDA é a utilização de drogas que ajam sobre o óxido nítrico (NO), visto que este tem sido relacionado com a esquizofrenia e está estreitamente relacionado ao sistema glutamatérgico (BERNSTEIN; BOGERTS; KEILHOFF, 2005). A enzima que sintetiza o NO no SNC, a NO sintase neuronal (nNOS), depende de cálcio para seu funcionamento e está acoplada ao receptor NMDA.

A ativação dos receptores NMDA pelo glutamato resulta em influxo de cálcio na célula, que se liga à calmodulina e esta estimula a enzima nNOS a produzir NO ao converter L-arginina em L-citrulina. O NO, por sua vez, ativa a enzima guanilato ciclase solúvel (sGC), que aumenta a produção de GMP cíclico. Essa via, “NMDA-NO-GMPC”, modula a liberação de neurotransmissores relacionados à esquizofrenia, tais como dopamina e glutamato (BLACK; MATTHEWS; HUMPHREY, 1994; LONART; WANG; JOHNSON, 1992).

Além de ativar a sGC, o NO age em outras vias através da nitrosilação direta de proteínas como a CREB (*cAMP response element-binding protein*) e pode ter efeito direto na formação da memória, na LTP e em processos neuroprotetores e neurodegenerativos possivelmente relacionados à esquizofrenia (BERNSTEIN et al., 2011; WEBER et al., 2013).

Alguns estudos demonstraram efeitos neuroprotetores do NO (RAUHALA et al., 1996; RAUHALA; LIN; CHIUEH, 1998; WINK et al., 1993; WINK; MITCHELL, 1998). Por exemplo, foi demonstrado que o DETA-NONOate, um doador de NO, inibe a morte neuronal induzida pelo peróxido de hidrogênio em ratos com uma semana de vida (FERNÁNDEZ-TOMÉ et al., 1999). Existem, também, relatos de que o nitroprussiato de sódio, outro doador de NO, estimula o crescimento neuronal *in vitro* (HINDLEY et al., 1997).

É possível que o NO influencie tanto a maturação neuronal quanto a sinaptogênese durante o desenvolvimento neuronal. Um distúrbio na sua liberação ou nas vias que o regulam poderia interferir nesses processos, estando de acordo com a hipótese do neurodesenvolvimento da esquizofrenia (OGILVIE et al., 1995; WU; WAID; MCLOON, 1996).

Em revisão sistemática que investigou o papel do NO nos pacientes com esquizofrenia, foram encontrados, inicialmente, resultados aparentemente contraditórios. Alguns trabalhos selecionados na revisão apontavam para um aumento na neurotransmissão mediada pelo NO, enquanto outros indicavam uma diminuição. Todavia, chegou-se à conclusão que os estudos apresentando menos fatores de confusão e que possuíam melhor delineamento direcionavam para uma redução na neurotransmissão mediada pelo NO na esquizofrenia (OLIVEIRA; ZUARDI; HALLAK, 2008).

Foi demonstrado que a administração de nitroprussiato de sódio, uma droga doadora de NO, se mostrou capaz de abolir por completo as alterações comportamentais induzidas em ratos medicados com fenciclidina (BUJAS-BOBANOVIC et al., 2000). Estes mesmos autores demonstraram que inibidores da NOS, ao impedirem a síntese de NO, potencializavam os efeitos da fenciclidina (BUJAS-BOBANOVIC; ROBERTSON; DURSUN, 2000). Em sintonia com esse achado, foi reportado que outro doador de NO, o S-nitroso-N-acetilpenicilamina (SNAP), revertia totalmente os efeitos comportamentais em ratos tratados com MK-801, substância com efeitos antagonistas NMDA semelhantes aos da fenciclidina (YAMADA et al., 1996); e que o molsidone, substância também doadora de NO, foi capaz de atenuar, em roedores, as estereotipias e a ataxia induzidas pela administração do MK-801 (PITSIKAS; ZISOPOULOU; SAKELLARIDIS, 2006). Somam-se a esses achados, os efeitos preventivos e terapêuticos da nitroglicerina (NTG), outro doador do NO, e do nitroprussiato de sódio nas

alterações comportamentais induzidas por cetamina em ratos (KANDRATAVICIUS et al., 2015).

Esses achados permitem a construção da hipótese de que possa haver um déficit ou uma desregulação nas vias do NO na esquizofrenia. E, indo além, é possível que doadores de NO como, por exemplo, o nitroprussiato de sódio, o MNT ou a NTG, possam apresentar um efeito benéfico em pacientes com esta patologia.

1.4. DOADORES DE ÓXIDO NÍTRICO

Os nitratos, drogas doadoras de NO, compartilham várias características no que concerne ao seu efeito hemodinâmico e são utilizados desde o final do século XIX para o tratamento de doença da artéria coronária (*angina pectoris*), insuficiência cardíaca e infarto agudo do miocárdio (NOSSAMAN; NOSSAMAN; KADOWITZ, 2010).

O benefício clínico dos nitratos é consequência da vasodilatação das artérias coronárias, que resulta em suprimento sanguíneo aumentado para o coração, e da venodilatação, que diminui a pré-carga cardíaca; a combinação de suprimento aumentado e diminuição da demanda de oxigênio fornece um benefício terapêutico único na isquemia cardíaca. (BODE-BÖGER; KOJDA, 2005). Vasos arteriais de menor calibre são menos sensíveis aos nitratos, o que torna rara uma queda pressórica clinicamente significativa em doses terapêuticas, a não ser que haja o uso concomitante de outras drogas. (CHEITLIN, 2003; SPEAKMAN; KLONER, 1999).

A NTG é o mais antigo e o mais estudado dos nitratos orgânicos (ORNs) e é utilizada como protótipo nos estudos dessa classe farmacológica. Em estudos com voluntários saudáveis, os efeitos hemodinâmicos e hormonais do fármaco são a vasodilatação periférica, o aumento da frequência cardíaca, o aumento da norepinefrina sérica, o aumento da capacitância venosa e a diminuição da pressão de enchimento cardíaco. A pressão arterial tende a cair apenas em altas doses da administração venosa, ainda assim sem risco para o paciente. Cefaleia costuma ser o único efeito colateral relatado que pode impedir o uso da droga em indivíduos saudáveis (BENNETT; DAVIS, 1984; OLIVARI et al., 1983; PETERSSON et al., 2005).

Em um estudo em que foi avaliada a influência da NTG na hemodinâmica cerebral de voluntários saudáveis, foram encontrados aumento do volume cerebral, vasodilatação de grandes vasos, diminuição da velocidade sanguínea, manutenção do fluxo sanguíneo e sinal *blood oxygen level dependency* (BOLD) inalterado. Infere-se que a ausência de ação da NTG nos capilares e vênulas, principais responsáveis pela alteração do sinal BOLD, explique tais

achados. Substâncias que alteram o sinal BOLD podem falsear os resultados como se tais alterações fossem consequência de uma mudança na atividade cerebral, porém esse não parece ser o caso com a NTG (ASGHAR, 2012).

O exato mecanismo de ação dos ORNs ainda não foi elucidado. Estes, ao contrário dos inorgânicos, não ativam a sGC em um sistema acelular, porém funcionam como pró-drogas que são bioativadas para liberar NO. Um dos mecanismos de bioativação propostos é o engendrado pela aldeído desidrogenase mitocondrial (mtALDH), que catalisa a reação de liberação do NO (MAYER; BERETTA, 2008). Além dessa enzima, outras foram implicadas na bioativação dos ORN, como a citocromo P450 3A, a Glutathione-S-Transferase (GST), a Xantina Oxido-Redutase e diferentes isoformas do citocromo P e da ALDH. Os ORN se diferenciam entre si pela maior ou menor seletividade que têm por cada uma dessas enzimas, o que leva a formação de metabólitos diferentes (PAGE; FUNG, 2013).

A tolerância vascular aos nitratos, que consiste na perda gradual dos efeitos vasculares, é conhecida há mais de um século (STEWART, 1905), porém vários aspectos desse fenômeno são desconhecidos ou controversos. Clinicamente, a tolerância é amenizada com a administração intermitente da droga (ABRAMS, 2002). Dentre as prováveis causas da tolerância estão a disfunção endotelial mediada pelos ORN, o desacoplamento da NOS endotelial, que é outro subtipo de NOS, a depleção de antioxidantes naturais e a inativação da mtALDH (MILLER; WADSWORTH, 2009; WEI et al., 2011).

1.5. NITROPRUSSIATO DE SÓDIO

Há poucos anos, o primeiro trabalho em humanos avaliando os efeitos da administração do nitroprussiato de sódio sobre os sintomas clínicos e a cognição na esquizofrenia foi realizado (HALLAK et al., 2013; MAIA-DE-OLIVEIRA et al., 2015a). Os resultados desse trabalho demonstraram um impacto significativo da administração de nitroprussiato de sódio sobre os escores de escalas clínicas, incluindo sintomas negativos, e testes cognitivos, com as medidas mais baixas de psicopatologia observadas por volta do 6º e 7º dias da administração da droga e o retorno progressivo às condições anteriores ao longo do mês.

Esses resultados sugerem que a modulação farmacológica dos níveis de NO no SNC seria capaz de melhorar sintomas da esquizofrenia sobre os quais os antipsicóticos atuais têm trazido pouco sucesso.

O porquê de o nitroprussiato de sódio melhorar os sintomas dos pacientes seria devido à sua capacidade de ativar a via “NMDA-NO-GMPc”, bem como as outras vias do NO. Partindo da hipótese de que os sintomas encontrados nos pacientes com esquizofrenia sejam devidos, ao menos em parte, a uma disfunção na neurotransmissão mediada pelo NO, o nitroprussiato de sódio, por ser uma droga doadora de NO, corrigiria essa disfunção e exerceria, assim, seus efeitos terapêuticos.

As peculiaridades da administração do nitroprussiato de sódio o tornam uma droga difícil de ser amplamente utilizada na prática clínica diária. A aplicação se dá apenas na forma intravenosa, em bomba de infusão, com monitorização constante dos parâmetros hemodinâmicos do paciente e, de preferência, com a presença de profissionais médicos durante a infusão.

Devido a isso, no estudo atual, decidiu-se realizar um ensaio clínico com um doador de NO seguro, barato, de fácil administração por via oral, com décadas de uso na prática clínica e disponível no mercado brasileiro.

1.6. MONONITRATO DE ISOSSORBIDA

Ao contrário do nitroprussiato de sódio, que é um nitrovasodilatador inorgânico, o MNT encontra-se na classe dos ORN ao lado da NTG, do tetranitrato de pentaeritritila, do dinitrato de isossorbida e do nicorandil. Junto com estes dois últimos, o MNT é considerado de baixa potência por ter dois ou menos grupos doadores de NO (OMAR; ARTIME; WEBB, 2012).

O MNT de liberação prolongada tem pico plasmático em 3h, meia-vida de 6,2h, metabolismo de primeira passagem próximo a zero, biodisponibilidade de quase 100% e 1 a 2% da dose oral excretada de forma inalterada na urina. O metabolismo se dá pelo citocromo P450 e por conjugação hepática. Essas características significam que a droga possui poucas interações farmacológicas com outros fármacos. O perfil farmacocinético permite uma queda controlada dos níveis plasmáticos da droga, o que reduz o desenvolvimento de tolerância, porém sem *wash-out* rápido o suficiente para causar angina de rebote (ABSHAGEN, 1992; KOSOGLOU et al., 1995).

No Brasil, o mononitrato de isossorbida de liberação prolongada (Monocordil Retard 50mg – Baldacci®, São Paulo-SP), está disponível na dose de 50mg, apresenta baixa metabolização de primeira passagem hepática, liberação controlada e facilidade de aquisição. A dose entre 30 e 60mg é considerada inicial para o tratamento das doenças cardiológicas. A

administração uma vez ao dia é recomendada por apresentar menor desenvolvimento de tolerância (NORDLANDER; WALTER, 1994; WISENBERG et al., 1989).

1.7. NEUROIMAGEM FUNCIONAL

A imagem é considerada funcional quando o sinal obtido pela técnica deriva do fluxo sanguíneo ou de processos elétricos ou químicos que refletem o funcionamento dos tecidos em análise. No caso da neuroimagem funcional, os principais parâmetros utilizados para a aferição nas várias técnicas disponíveis são as diferenças na oxigenação, o metabolismo da glicose, as mudanças no fluxo sanguíneo ou as diferenças de sinal geradas pela ligação de neurotransmissores e outras moléculas de sinalização.

Um dos métodos de obtenção de neuroimagem mais usados é o que detecta as diferenças no estado de oxigenação do sangue na região cerebral (*blood oxygen level dependency*—BOLD) (TRACEY, 2001). O BOLD é realizado através de uma ressonância nuclear magnética (RNM) e tem atributos como segurança, confiabilidade e oferece uma boa localização espacial com uma resolução temporal adequada, sem efeitos colaterais ao paciente (NORRIS, 2006).

Foi demonstrado em pesquisas clínicas que a neuroimagem funcional pode detectar mudanças na atividade cerebral desencadeadas pela administração de drogas como a apomorfina, cocaína, fenfluramina, cetamina e nicotina (LESLIE; JAMES, 2000). Em relação aos antipsicóticos, demonstrou-se que o sinal baseado na técnica BOLD é modificado de acordo com a afinidade que o antipsicótico tem pelos receptores dopaminérgicos D2 (RÖDER; HOOGENDAM; VAN DER VEEN, 2010).

Outro método de avaliação do funcionamento cerebral através da RNM é a marcação dos spins arteriais (do inglês, *Arterial Spin Labeling*—ASL). Esta técnica utiliza a água presente no sangue arterial como traçador, excluindo a necessidade de injeção de contraste no paciente, assim como o BOLD. Com o ASL, é possível fazer medidas absolutas do fluxo sanguíneo, algo que o BOLD não faz, com alta resolução espacial e temporal. Atualmente, há quatro principais métodos de marcação dos spins arteriais: ASL pulsado (PASL), ASL contínuo (CASL), ASL pseudocontínuo (pCASL) e ASL selecionado por velocidade (VS-ASL). A diferença entre os quatro reside na forma de marcar a molécula de água no sangue. A pCASL é considerada a mais efetiva e fácil de aplicar [Figura 3 — (HUAN TAN et al., 2010)].

Figura 3 – Métodos de marcação para a aquisição de imagens no ASL

ASL pulsado (PASL) satura ou inverte os spins em uma grande região próxima ao local de aquisição da imagem. ASL contínuo e pseudocontínuo (CASL e PCASL) marcam um pequeno plano de spins continuamente. ASL selecionado por velocidade (VS-ASL) inverte spins de determinada velocidade para aferir a perfusão — extraído de (HUAN TAN et al., 2010).

O BOLD apresenta maior resolução temporal, menor *Signal-to-Noise-Ratio* (SNR) e é mais fácil de ser aplicado. O ASL é melhor para mudanças lentas no funcionamento cerebral, tem melhor resolução espacial, quantifica de forma absoluta o fluxo sanguíneo e faz medidas absolutas do estado de repouso cerebral. (BOROGOVAC; ASLLANI, 2012).

Uma metanálise publicada em 2003 demonstrou que a principal característica encontrada nos estudos de imagem funcional em pacientes esquizofrênicos, quando comparados a controles saudáveis, é a ‘hipofrontalidade’ (do inglês *hypofrontality*), evidenciada por uma deficiência no fluxo e no metabolismo do lobo frontal (DAVIDSON; HEINRICHS, 2003). Vale ressaltar que a maioria dos estudos avaliados na metanálise baseava-se em exames de PET e SPECT, métodos que utilizam radiotraçadores.

Em um trabalho controlado utilizando ASL e realizado em pacientes com diagnóstico de esquizofrenia, virgens de tratamento e no estado de repouso, foi demonstrada hipoperfusão bilateralmente nos lobos frontais, no giro do cíngulo anterior e medial e bilateralmente nos lobos parietais. Uma perfusão aumentada foi evidenciada no cerebelo, ponte e tálamo (SCHEEF et al., 2010). Um estudo realizado comparando indivíduos saudáveis e pacientes com esquizofrenia em tratamento antipsicótico estável mostrou similaridades com o trabalho de Scheef, porém os achados foram mais focais, o que sugere uma normalização parcial do funcionamento cerebral com o tratamento (PINKHAM et al., 2011).

Outro estudo se propôs a avaliar, através do ASL, o padrão de perfusão em pacientes com alucinações auditivas refratárias às medicações, também no estado de repouso. Foi encontrado um padrão de perfusão aumentada no giro superior esquerdo do lobo temporal

desses pacientes (HOMAN et al., 2013). Em outro experimento, ao serem avaliadas as diferenças entre controles saudáveis e pacientes com esquizofrenia, através do ASL e da actigrafia, esta última para avaliar a atividade motora, concluiu-se que a atividade motora dos pacientes é relacionada com regiões cerebrais diferentes das dos controles e que isso sugere uma disfunção em gânglios da base (WALTHER et al., 2011).

Em revisão sistemática, GUIMARÃES et al., 2016, avaliaram qualitativamente os achados dos estudos de neuroimagem que aplicaram a técnica do ASL em pacientes com esquizofrenia; as regiões com fluxo sanguíneo cerebral reduzido foram cíngulo anterior, giro fusiforme, lobo frontal, giro intermediário esquerdo do lobo frontal, giro inferior do lobo frontal, giro lingual, giro intermediário occipital e lobo parietal. O putamen foi a única região com fluxo aumentado. Os achados utilizando o ASL não são inéditos e estão de acordo com pesquisas anteriores, o que evidencia a confiabilidade dessa técnica (DAVIDSON; HEINRICHS, 2003).

Uma evolução da técnica de neuroimagem funcional compreende os estudos de conectividade, que estimam quais regiões ativam ou desativam sincronicamente em repouso ou em atividades pré-estabelecidas. Em estudo onde foram avaliados 17 pacientes em alto risco, 197 pacientes no primeiro episódio psicótico e em sua maioria livres de antipsicóticos e 146 pacientes crônicos, as alterações em comum entre todos os grupos foram as de conectividade do lobo frontal. Com o tempo de doença, as alterações foram se tornando mais difusas, com destaque para prejuízos no funcionamento do tálamo (LI et al., 2016).

Até o momento, não existem estudos em que foi avaliada a adição do MNT ao tratamento de pacientes com esquizofrenia e o impacto disso nos exames de neuroimagem funcional e nos parâmetros clínicos dos pacientes.

Tomados em conjunto, os dados apresentados sugerem que o sistema do NO esteja envolvido na neurobiologia da esquizofrenia, tanto através da via NMDA-GMPc-NO quanto de outros alvos deste sistema, e que fármacos doadores desse neurotransmissor possam surtir efeitos terapêuticos. Foi formulada, então, a hipótese de que um nitrato orgânico, o MNT, poderia potencializar o efeito do antipsicótico quando associado ao tratamento farmacológico habitual de pacientes ainda sintomáticos apesar do tratamento otimizado. Também foi levantada a hipótese de que o exame de neuroimagem funcional seria capaz de detectar alterações decorrentes do uso do MNT em regiões reconhecidamente relacionadas à esquizofrenia.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da associação de MNT ao tratamento ambulatorial de indivíduos com esquizofrenia em uso de antipsicóticos e com persistência de sintomas moderados a graves.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) avaliar o efeito do MNT sobre os sintomas positivos, negativos ou de psicopatologia geral em comparação ao placebo em termos de:

- mudanças nos escores da Escala de Sintomas Positivos e Negativos para Esquizofrenia (PANSS) como principal medida de desfecho;
- mudanças nos escores das subescalas da PANSS: sintomas positivos, sintomas negativos e sintomas gerais;
- mudanças na pontuação da Escala de Impressão Clínica Global (CGI).

b) Avaliar o efeito do MNT sobre a funcionalidade do paciente em termos de:

- mudanças na Escala de Avaliação do Funcionamento Global (GAF).

c) Avaliar o efeito do MNT sobre os sintomas cognitivos em termos de:

- mudanças nos escores da bateria consensual cognitiva MATRICS (MCCB).

d) Investigar a segurança e a tolerabilidade do MNT em indivíduos com esquizofrenia, com especial atenção para:

- agravamento dos sintomas;
- efeitos adversos graves relatados pelos pacientes e observados pelo pesquisador e padronizados de acordo com a Escala de Efeitos Colaterais (UKU).

e) Avaliar o efeito do MNT nos padrões de ativação cerebral em termos de:

- mudanças na RNM funcional utilizando o método ASL.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. SUJEITOS

Foram incluídos pacientes com esquizofrenia diagnosticados segundo os critérios do DSM-IV-R (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders—Fourth Edition Revised*), que estavam em acompanhamento psiquiátrico regular no Ambulatório de Psiquiatria do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP), mais especificamente no Ambulatório de Reabilitação Psicossocial (AREP) e no Ambulatório de Esquizofrenia (APQE).

Os pacientes foram randomizados em dois grupos conforme a medicação de início (placebo ou MNT). A randomização e o cegamento foram realizados pelo Laboratório de Psicofarmacologia da Divisão de Psiquiatria do Departamento de Neurociências e Ciências do Comportamento do HCFMRP-USP. O pesquisador responsável não teve acesso a esses dados até o término do ensaio.

Os seguintes critérios foram seguidos:

Critérios de inclusão

- Pacientes de ambos os sexos, com diagnóstico de esquizofrenia segundo o DSM-IV-R, em tratamento antipsicótico ambulatorial e com sintomas presentes nas dimensões positiva ou negativa (escore maior ou igual a quatro em qualquer item das escalas positiva ou negativa da PANSS).
- Idade entre 18 e 50 anos.

Critérios de exclusão

- Presença de condição médica relevante (doenças cardiovasculares, hipertensão arterial grave, insuficiência renal, doença hepática, hipotireoidismo, hiponatremia, hipovitaminose B12, hipertensão intracraniana prévia, epilepsia, gravidez, amamentação). Aqui se inclui, também, pacientes que tenham sinais e sintomas sugestivos de hipotensão arterial tais como visão turva, tonturas, palidez e extremidades frias.
- História de hipersensibilidade aos ORN.
- Diagnóstico de transtorno por uso de substâncias segundo os critérios do DSM-IV-R, exceto nicotina.

- Pacientes com comorbidades psiquiátricas graves e que sejam o foco da atenção clínica no período do recrutamento, como episódio depressivo maior e transtorno obsessivo-compulsivo.
- Pacientes com alteração no esquema antipsicótico nos últimos 30 dias.
- Pacientes com critérios clínicos para internação integral.

Quando os pacientes com diagnóstico de esquizofrenia fazem a avaliação inicial nos ambulatorios do HCFMRP-USP, são feitos de rotina todos os exames necessários para identificação de uma condição médica geral relevante; anamnese detalhada (história clínica e exame físico) com informações colhidas do próprio paciente, de seus familiares e de seu prontuário médico; ressonância nuclear magnética; avaliação cardiológica (incluindo eletrocardiograma); função renal (ureia e creatinina); função hepática (TGO, TGP, bilirrubinas, albumina, TP); função tireoidiana (TSH e T4 livre); rastreio para drogas de abuso; teste de gravidez. Tais exames foram realizados em todos os sujeitos da pesquisa.

3.2. INSTRUMENTOS DE AVALIAÇÃO

As escalas foram escolhidas de modo a permitir a avaliação dos sintomas positivos, negativos e cognitivos dos pacientes durante o curso do ensaio clínico.

- **Entrevista Estruturada para o DSM-IV (*Structured Clinical Interview for DSM-IV—SCID-IV*):**

Foram utilizados para triagem e confirmação diagnóstica os critérios do DSM-IV-R para esquizofrenia. Ainda não havia, durante o período do ensaio, entrevista estruturada para o DSM-5 validada no Brasil. Por isso, foi aplicada a SCID-IV (DEL-BEN et al., 2001). É importante ressaltar que não houve alterações essenciais na categoria diagnóstica da esquizofrenia entre os DSM-IV e o DSM-5, e as principais mudanças foram a exclusão dos subtipos do transtorno e a eliminação dos sintomas de primeira ordem de Schneider como únicos necessários para preencher os critérios A da esquizofrenia (TANDON et al., 2013).

- **Escala de Avaliação das Síndromes Positiva e Negativa para Esquizofrenia (*Positive and Negative Syndromes Scale — PANSS — ANEXO A*):**

A PANSS foi desenvolvida a partir da *Brief Psychiatric Rating Scale* (BPRS) e da *Psychopathology Rating Scale* (PRS) com o intuito de avaliar os sintomas positivos e negativos da esquizofrenia. Ela é composta por 30 itens, sendo um grupo de 7 sintomas positivos da

esquizofrenia, outro de 7 sintomas negativos e 16 itens restantes que constituem uma escala de psicopatologia geral.

Nesse estudo, utilizamos a versão traduzida e adaptada para o português (VESSONI, 1993) de modo a avaliar a intensidade dos sintomas positivos e negativos nos pacientes esquizofrênicos. A escala geral também foi aplicada.

- **Bateria Cognitiva Consensual MATRICS (*Measurement and Treatment Research to Improve Cognition in Schizophrenia*—*Consensus Cognitive Battery*—ANEXO B):**

O *National Institute for Mental Health* (NIMH) desenvolveu uma bateria de testes cognitivos específica para esquizofrenia durante consenso realizado em 2008. O consenso foi fruto de uma iniciativa do NIMH conhecida como *Measurement and Treatment Research to Improve Cognition* (MATRICS), que tinha como objetivo facilitar o desenvolvimento de tratamentos e avaliações para a síndrome cognitiva da esquizofrenia. A iniciativa postulava que a ausência de instrumentos padronizados e específicos dificultava o desenvolvimento de novas terapias nessa dimensão sintomatológica. Após definição dos testes que fariam parte da avaliação, validação multicêntrica e normatização foram realizadas e nasceu o MCCB com o objetivo de ser o instrumento padrão de ensaios clínicos que avaliem intervenções na dimensão cognitiva (KERN et al., 2008; NUECHTERLEIN et al., 2008).

Um estudo que avaliou os correlatos clínicos e cognitivos da bateria evidenciou alta correlação com o quociente de inteligência (QI), correlação de moderada a alta entre os domínios, relação modesta com gravidade e tipo de sintomas e alta relação com desfecho ocupacional (AUGUST et al., 2012). O efeito de aprendizado é considerado baixo e o aumento nas pontuações tende a reduzir em aplicações sucessivas (GRAY et al., 2014).

O MCCB consiste em dez testes que avaliam sete domínios cognitivos, cada teste diz respeito a um domínio. Os domínios são: velocidade de processamento, atenção/vigilância, memória de trabalho, aprendizado verbal, aprendizado visual, raciocínio e resolução de problemas e cognição social. Os testes são: teste de trilhas: parte A (TMT); breve avaliação da cognição em esquizofrenia: codificação de símbolos (BACS-SC); teste Hopkins de aprendizagem verbal–revisado (HVLT-R™); escala de memória de Wechsler-III (WMS III): *span* espacial; *span* da letra e número (LNS); bateria de avaliação neuropsicológica (NAB): labirintos; teste breve de memória viso-espacial–revisado (BVMT-R™); fluência categórica: nomeação de animais (Fluência); Mayer-Salovey-Caruso - teste de inteligência emocional: (MSCEIT™); manejo de emoções; teste de desempenho continuado - pares idênticos (CPT-IP).

A escala foi validada, traduzida e normatizada, recentemente, para a população brasileira pelo grupo de pesquisa do Programa de Esquizofrenia da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina (PROESQ—UNIFESP—EPM). No Brasil, a escala foi intitulada de Bateria Cognitiva Consensual MATRICS (FONSECA et al., 2017).

A MCCB foi aplicada nos pacientes desse ensaio clínico para avaliação do impacto do MNT na cognição.

- **Escala de efeitos colaterais (*Ugvalg for Kliniske Undersgeiser* — UKU — ANEXO C):**

A escala foi criada para avaliar os efeitos colaterais dos psicotrópicos (LINGJAERDE et al., 1987). É dividida em quatro grupos de sintomas: psíquicos, neurológicos, autonômicos e outros. Utilizaremos a versão traduzida para o português do livro Escalas de Avaliação Clínica em Psiquiatria (GORENSTEIN, 2008).

- **Escala de Impressão Clínica Global (CGI):**

É uma simples escala subjetiva de avaliação clínica que se propõe a mensurar a gravidade do transtorno em questão com apenas uma pergunta (NIMH, 1976). Pergunta realizada: “Considerando toda sua experiência com pacientes esquizofrênicos, qual a gravidade da doença do paciente durante a última semana?”. As respostas são: 1 = normal, não doente; 2 = minimamente doente; 3 = levemente doente; 4 = moderadamente doente; 5 = marcadamente doente; 6 = gravemente doente; 7 = entre os doentes mais graves.

- **Escala de Avaliação Funcional (GAF):**

A GAF é um escala simples de avaliação funcional presente no DSM-IV-R. Sua pontuação varia de 0 a 100 e cada 10 pontos representa um estrato de funcionamento do paciente que leva em conta sintomas e funcionamento social, acadêmico e laboral (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 1994).

3.3. DROGAS

MNT

O MNT foi utilizado na forma de cápsulas de liberação prolongada, via oral, contendo 50mg da substância ativa (Monocordil Retard, Baldacci®, São Paulo-SP).

A dose inicial para *angina pectoris* é a de 30mg a 60mg e o incremento das doses se baseia na tolerabilidade e efetividade do fármaco, podendo chegar a 240mg em casos excepcionais. Efeitos adversos hemodinâmicos são raros, sendo os mais comuns cefaleia,

náuseas e vômitos. O comprimido de 50mg, liberação prolongada, é o mais facilmente encontrado no mercado brasileiro, motivo da escolha.

Os pacientes foram orientados a ingerir a medicação sem mastigar ou abrir a cápsula, 1h após o café da manhã.

Placebo

O placebo foi constituído de uma cápsula gelatinosa idêntica, porém sem a substância ativa, contendo apenas farinha, tendo sido fornecido pelo fabricante da medicação ativa.

3.4. PROCEDIMENTO

O ensaio foi conduzido segundo a declaração de Helsinki, aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do HCFMRP-USP e registrado no Registro Brasileiro de Ensaio Clínicos (RBR-8kyq7g).

Os pacientes foram convidados no dia da sua consulta ambulatorial a participar do experimento. Na ocasião, os pacientes e seus familiares responsáveis foram informados e esclarecidos quanto às características e às implicações do estudo e, os que concordaram em participar, leram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE A), elaborado de acordo com Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde sobre Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Ministério da Saúde conforme aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP (Parecer: 773.290 — ANEXO D). Após o consentimento para participação no estudo, os pacientes permaneceram com o tratamento antipsicótico habitual, sem alterações por oito semanas, tempo de duração da pesquisa. Durante esse período, os pacientes foram monitorados quanto à necessidade de alteração na dose ou no tipo de antipsicótico, fator que determinaria a exclusão do estudo.

Os voluntários foram randomizados em dois grupos na razão de 1:1. A ordem de tratamento (MNT/placebo ou placebo/MNT) foi gerada em computador por sequenciamento aleatório em blocos de 4 e estratificados segundo sexo (masculino, feminino). Um dos grupos iniciou com a droga ativa e assim permaneceu por 4 semanas, enquanto o outro grupo iniciou com o placebo e assim permaneceu por quatro semanas. Findado este prazo, o grupo que iniciou com a droga ativa fez a troca desta para o placebo; o grupo que iniciou com placebo, fez a troca para a droga ativa.

Cada participante, e também os familiares, foi orientado a proceder da seguinte forma caso apresente o efeito colateral mais comum com o uso do MNT, que é a cefaleia: utilizar o

Paracetamol 500mg até de 6/6h (todos receberam receitas com a devida prescrição da droga, disponível de forma gratuita no Sistema Único de Saúde). Os pacientes e familiares foram orientados também a procurar o serviço de psiquiatria ou o pesquisador responsável em caso de reagudização sintomática. Os ambulatorios do AREP funcionam às terças, quintas e sextas à tarde e o do APQE, às sextas pela manhã, fato conhecido por todos os seus pacientes. Nos casos de exclusão por reagudização, seria tomada a conduta padrão dos ambulatorios do HCFMRP-USP, que é a antecipação da consulta, nos casos em que for suficiente, ou a solicitação de internação integral no SUS, quando necessária. Nos casos de cefaleia intensa ou que não cedesse com o uso de analgésicos, os pacientes foram orientados a entrar em contato com o ambulatorio ou, se fora de horário comercial, com o pesquisador responsável, que é médico, para definição da melhor conduta em cada caso. Ressaltamos que a cefaleia causada por nitratos cede após a suspensão do fármaco. Pacientes e familiares foram alertados a considerar cefaleia intensa qualquer dor de cabeça fora dos padrões individuais de cefaleias prévias.

Os pacientes, no primeiro dia, foram submetidos à aplicação dos critérios do DSM-IV-R, da SCID-IV, da PANSS, da UKU, da CGI, da GAF e da MCCB. Os critérios do DSM-IV-R e a SCID-IV foram aplicados apenas uma vez, antes do início dos outros procedimentos, com o objetivo de confirmação diagnóstica. A escala psicopatológica, PANSS, e as escalas UKU, GAF e CGI foram aplicadas antes do início da administração da MNT/placebo e, então, semanalmente, com a última aplicação sucedendo o último dia de administração do fármaco/placebo, após oito semanas. A avaliação cognitiva foi realizada em três oportunidades, no dia que precedeu a primeira aplicação do fármaco/placebo, no dia da troca entre os grupos (após quatro semanas) e no dia que sucedeu a última aplicação (oito semanas — Tabela 1).

Três RNMs funcionais (fRNM) foram realizadas ao longo do ensaio: a primeira antes de iniciar o fármaco/placebo, a segunda no dia do cruzamento e a terceira no último dia do ensaio. Foi aplicada a técnica ASL.

Cada paciente recebeu uma caixa com 28 cápsulas (placebo ou droga ativa) na primeira fase do estudo (28 dias) e outra caixa (com o que ainda não usara), também com 28 cápsulas, após o cruzamento. Foram considerados como grupo 1 os sujeitos que iniciaram com placebo e como grupo 2 os que iniciaram com o MNT.

Tabela 1 – Delineamento do estudo

Grupo 1	Início com placebo
D0 (Sem droga)	Escalas Psicométricas, inclusive MCCB, e neuroimagem
D1-D28 (placebo)	Escalas Psicométricas semanalmente, exceto MCCB
D28 (Último dia placebo)	Escalas Psicométricas, inclusive MCCB, e neuroimagem
D29-D56 (MNT)	Escalas Psicométricas semanalmente, exceto MCCB
D56 (Último dia MNT)	Escalas Psicométricas, inclusive MCCB, e neuroimagem
Grupo 2	Início com MNT
D0 (Sem droga)	Escalas Psicométricas, inclusive MCCB, e neuroimagem
D1-D28 (MNT)	Escalas Psicométricas semanalmente, exceto MCCB
D28 (Último dia MNT)	Escalas Psicométricas, inclusive MCCB, e neuroimagem
D29-D56 (placebo)	Escalas Psicométricas semanalmente, exceto MCCB
D56 (Último dia placebo)	Escalas Psicométricas, inclusive MCCB, e neuroimagem

D: dia de estudo, MCCB: Bateria Cognitiva Consensual MATRICS, MNT: Mononitrato de isossorbida.

Todas as avaliações foram realizadas pelo pesquisador responsável. O avaliador foi treinado na aplicação da MCCB por neuropsicólogo do PROESQ—UNIFESP—EPM, grupo responsável pela tradução, validação e normatização da escala no Brasil. Para a aplicação da PANSS, UKU, GAF e CGI houve treinamento recebido por médico-psiquiatra doutorando do HCFMRP-USP e pesquisador do mesmo grupo.

3.5. ANÁLISE DOS RESULTADOS

A análise estatística foi feita com o “*Statistical Package for the Social Sciences*” (SPSS), versão 17.0.

Para o ensaio do tipo cruzado, simples e com dois grupos, os efeitos foram avaliados da seguinte forma: $X_{m,n}$, onde m (1 ou 2) representa o tratamento (1 = placebo ou 2 = MNT) e onde n (1 ou 2) representa o período (1 = primeiras quatro semanas ou 2 = últimas quatro semanas). Para avaliar o tratamento, as somas do tratamento 1 (placebo) foram comparadas às somas do tratamento 2 (MNT) — $X_{PLB,1} + X_{PLB,2}$ vs $X_{MNT,1} + X_{MNT,2}$. Contudo, antes disso, foram excluídos a ordem de início — $X_{PLB,1} + X_{MNT,1}$ vs $X_{PLB,2} + X_{MNT,2}$ — e o efeito residual — $X_{PLB,1} + X_{MNT,2}$ vs $X_{PLB,2} + X_{MNT,1}$ — como fatores significativos.

Os escores totais da PANSS, da MCCB, da GAF e da UKU foram submetidos à análise de variância de medidas repetidas com os fatores tempo, grupo de início da droga (placebo ou MNT) e interação entre os dois fatores. A ordem de administração da medicação foi considerada como medida entre grupos. Quando não houve uma diferença significativa entre os fatores tempo e grupo de início, porém com uma interação significativa entre tempo e droga, os dados de cada grupo individualmente (todos com MNT e todos com placebo) foram submetidos a um teste t pareado em cada ponto de medida semanal (semana 1 do placebo vs semana 1 de MNT, e assim sucessivamente para as 4 semanas de avaliação em cada medicamento).

Os escores da CGI, por ser escala ordinal, foram analisados para cada grupo independentemente (MNT e placebo) pelo teste de Friedman, que é um teste estatístico não paramétrico utilizado para detectar diferenças no tratamento ao longo de medidas repetidas.

3.6. ANÁLISE DOS DADOS CLÍNICOS E DEMOGRÁFICOS

Comparamos os grupos (início com placebo e início com MNT) quanto à idade, equivalentes de Olanzapina, tempo de doença e escolaridade. Para isso, um teste t pareado de amostras independentes foi aplicado.

3.7. ANÁLISE DAS IMAGENS

O experimento foi conduzido em três sessões diferentes de ressonância magnética e foram incluídos na análise final apenas os pacientes que realizaram as três sessões. O primeiro foi um dia antes do início do MNT ou placebo; o segundo, um dia antes do cruzamento; e o terceiro, no último dia do ensaio.

Os dados de ressonância magnética foram adquiridos em um sistema de 3T (Philips Achieva, Países Baixos) usando uma bobina de cabeça de 32 canais para recepção e uma bobina de corpo para transmissão. As imagens pseudocontínuas de ASL (pCASL) foram obtidas usando uma sequência EPI 2D de disparo único com os seguintes parâmetros: TR / TE = 4000/14 ms, FA = 90 °, matriz = 160 × 160, FOV = 240 × 240 mm², 20 fatias de 5mm (sem espaço), duração da rotulagem = 1650 ms, atraso pós-rotulagem = 1525 ms, 50 pares de controle / etiqueta, duração total da digitalização = 6 min e 48 s. As imagens estruturais foram adquiridas usando uma sequência ponderada em T1 com eco gradiente 3D (TR / TE = 7 / 3,2ms, FA = 8 °, matriz = 240 × 240, FOV = 240 × 240mm², 160 fatias com resolução isotrópica de 1

milímetro). Todos os pacientes foram instruídos a permanecer acordados, pensar em nada em particular e se mover o menos possível durante o exame. Para quantificação do fluxo sanguíneo cerebral (CBF), uma imagem de densidade de prótons (M0) foi adquirida separadamente com a mesma geometria e parâmetros da sequência pCASL, mas sem pulsos de marcação.

Um kit de ferramentas ASL [ASLtbx (WANG et al., 2008)] disponível para o SPM12 foi usado para executar as etapas de processamento de imagem, consistindo em: correção de movimento, registro de imagens anatômicas, filtragem temporal, suavização espacial com um núcleo gaussiano isotrópico ($\text{FWHM} = 4 \text{ mm}$), quantificação de CBF e normalização para o espaço padrão MNI (resolução: $2 \times 2 \times 2 \text{ mm}^3$, tamanho da matriz: $79 \times 95 \times 79$). Também foram executadas etapas adicionais para melhorar a quantificação do CBF: correção de movimento residual, remoção de imagens discrepantes de CBF e correção parcial de volume (PVE). Os detalhes da quantificação do CBF podem ser acessados em estudo anterior realizado por nosso grupo de pesquisa (OLIVEIRA et al., 2018).

Foram analisadas 16 regiões de interesse (ROI) selecionadas no atlas de Harvard-Oxford: córtex pré-frontal dorsolateral direito e esquerdo, cíngulo anterior, cíngulo posterior, hipocampo direito e esquerdo, tálamo, amígdala, lobo parietal inferior (porções anterior e posterior do giro supra-marginal) e giro angular).

Para a análise do CBF, foi utilizado o software R (R Development Core, 2008). As diferenças entre os grupos foram avaliadas no nível do ROI usando testes t de duas amostras (teste t de Welch) e correção para comparação múltipla (correção de FDR). Realizamos duas análises distintas: Grupo 1 + Grupo 2 na linha de base em comparação com o último dia do medicamento ativo para cada grupo ($[G1 + G2] \times G1$ em T1, $[G1 + G2] \times G2$ em T2) e dentro do grupo comparação ($G1$ em T0 $\times G1$ em T1, $G1$ em T0 $\times G1$ em T2 e $G2$ em T0 $\times G2$ em T1, $G2$ em T0 $\times G2$ em T2).

4. RESULTADOS

O recrutamento e todos os procedimentos foram realizados no período entre março de 2015 e dezembro de 2017. Vinte e quatro pacientes foram incluídos no ensaio, dos quais 20 completaram os procedimentos (escalas, MCCB e avaliações semanais) e 16, além dos procedimentos, foram submetidos a três fRNM. Na figura 4 está o fluxograma dos pacientes durante o ensaio conforme modelo do *Consolidated Standards of Reporting Trials (CONSORT)* (MOHER et al., 2012).

Figura 4 – Fluxograma conforme o *Consolidated Standards of Reporting Trials (CONSORT)*

Todos os pacientes estavam em uso de um ou mais antipsicóticos — nos casos de mais de um antipsicótico, o equivalente de Olanzapina considerado foi o do antipsicótico em maior dose ou da Clozapina, caso esta estivesse em uso (Tabela 2). Vinte sujeitos (83,3%) estavam em uso de Clozapina e, destes, 8 estavam em uso de Clozapina associada a algum potencializador.

Tabela 2 – Características demográficas dos sujeitos^a

Característica	
Idade em anos (DP)	34.7 (6.47)
Sexo Feminino, No (%)	3 (8.8%)
Tempo de doença em anos (DP)	14.87 (6.91)
Escolaridade em anos (DP)	11.57 (3.42)
Tabagismo, No (%)	3 (12,5%)
Eq. Olanzapina ^b mg (DP)	20.51 (7.78)
Clozapina, No (%)	20 (83,3%)
PANSS Total (DP)	76,33 (12.2)
PANSS Positiva (DP)	16.29 (5.17)
PANSS Negativa (DP)	24.5 (8.13)
PANSS Geral (DP)	35.6 (7.21)
CGI (DP)	6.1 ^c
GAF (DP)	41.25 (8.32)
MCCB Escore Composto (DP)	11.26 (13.46)

^a Análise de todos os sujeitos combinados. ^b Equivalente de Olanzapina em miligramas. ^c Teste de Friedman. CGI: Escala de Impressão Clínica Global Escala, GAF: Escala de Avaliação Funcional, MCCB: Bateria Cognitiva Consensual MATRICS, MNT: Mononitrato de Isossorbida, PANSS: Escala de Avaliação das Síndromes Positiva e Negativa para Esquizofrenia.

Cinco sujeitos estavam em uso de Clozapina, Lamotrigina e mais um segundo antipsicótico; sendo dois pacientes com Risperidona, um com Haloperidol e dois com Sulpirida. Dois estavam em uso de Clozapina associada a apenas Lamotrigina e um com Clozapina

associada a Risperidona. Dos quatro sujeitos que não estavam em uso de Clozapina, um deles fazia uso de Olanzapina devido a ter tido agranulocitose com Clozapina, outro usava Olanzapina em monoterapia, outro usava Paliperidona de depósito associada a Olanzapina e outro estava em monoterapia com Quetiapina.

Apenas três pacientes do sexo feminino foram selecionadas e uma delas retirou o consentimento na primeira semana do ensaio por motivos familiares não especificados. Apenas três pacientes eram tabagistas, todos os três eram do grupo que iniciou com o MNT e dois deles não terminaram o estudo. Na Tabela, 3 apresentamos as diferenças entre os grupos segundo a ordem de intervenção.

Tabela 3 – Diferenças sociodemográficas entre os grupos quanto à ordem de início do fármaco/placebo^a

Característica	Placebo	MNT	t	gl	Sig.
Idade, média (DP)	34 (7,0)	35,4 (6,3)	-0,52	22	0,61
Escolaridade, média (DP)	11,9 (3,7)	10,75 (3,3)	0,81	22	0,43
Tempo de Doença, média (DP)	14,2 (7,9)	15,5 (6,4)	-0,42	22	0,67
Sexo, No (%)					
Masculino,	11 (91,6)	10 (83,3)			
Feminino	1 (8,4)	2 (16,7)			
Eq. Olanzapina, média (DP)	17,84 (8,15)	23,1 (7,08)	-1,17	22	0,10
Refratários, No (%)	11 (91,6)	9 (75)			

^a Não houve diferenças entre os grupos quanto à idade, à escolaridade, ao tempo de doença e às doses das medicações em uso. Idade, escolaridade e tempo de doença estão em anos e o Equivalente de Olanzapina em miligramas (Intervalo de confiança > 95%).

4.1. ESCALA DE AVALIAÇÃO DAS SÍNDROMES POSITIVA E NEGATIVA PARA ESQUIZOFRENIA

Encontramos reduções estatisticamente significativas em todas as subescalas da PANSS. Consideramos a ordem em que os pacientes iniciaram o estudo como um fator entre sujeitos em todas as análises. De todas as escalas de avaliação clínica, houve diferença na linha de base entre os grupos — avaliação anterior ao início do ensaio — apenas na PANSS negativa (Tabela 4), esta, também, foi a única escala em que a ordem de início teve relevância, o que impede a avaliação do efeito do tratamento.

Tabela 4 – Diferenças entre os grupos nas escalas
psicométricas antes do início do ensaio^a

Característica	Placebo	MNT	Sig.
PANSS Total	78 (13.57)	74.7 (10.39)	0.52
PANSS Positiva	14.83 (4.58)	17.75 (5.32)	0.18
PANSS Negativa	27.4 (6.47)	20.92 (8.59)	0.03
PANSS Geral	35.2 (8.58)	35.2 (7.36)	0.75
CGI	5.16 (0.8)	4.7 (0.62)	0.31
GAF	39.6 (7.2)	45 (7.36)	0.35
MCCB Escore Composto	3.92 (9.11)	19.27 (12.8)	<0.01

^a Os valores em destaque representam diferenças estatisticamente significativas. Dados estão em média (DP). CGI: Escala de Impressão Clínica Global Escala, GAF: Escala de Avaliação Funcional, MCCB: Bateria Cognitiva Consensual MATRICS, MNT: Mononitrato de Isossorbida, PANSS: Escala de Avaliação das Síndromes Positiva e Negativa para Esquizofrenia.

4.1.1. Escore Total da PANSS

Não houve diferenças entre os grupos na linha de base, nem interferência da ordem nos escores, e os grupos se diferenciaram estatisticamente, segundo a análise de medidas repetidas. Isso significa que, independentemente da ordem iniciada, o período de uso do MNT se diferenciou estatisticamente do período de uso do placebo; $F_{8,144} = 7,31$; $p < 0,01$ (Gráfico 1).

4.1.2. Escore de Psicopatologia Geral da PANSS

Não houve diferenças entre os grupos na linha de base, nem interferência da ordem nos escores e os grupos se diferenciaram estatisticamente, segundo a análise de medidas repetidas. Isso significa que, independentemente da ordem iniciada, o período de uso do MNT se diferenciou estatisticamente do período de uso do placebo; $F_{8,144} = 9,01$ ($p < 0,001$).

Após a análise de medidas repetidas evidenciar mudanças com significância estatística, fizemos o teste t pareado entre o grupo placebo e o grupo MNT, que evidenciou mudanças a partir da segunda semana (Gráfico 2).

Gráfico 1 – PANSS Total: Teste t de amostras pareadas

As diferenças alcançaram significância estatística a partir da terceira semana. Semana 3: $t = 2,25$; $gl = 20$; $p < 0,036$. Semana 4: $t = 2,05$; $gl = 29$; $p < 0,05$. MNT: Mononitrato de Isossorbida, PANSS: Escala de Avaliação das Síndromes Positiva e Negativa para Esquizofrenia. As barras verticais indicam o erro padrão da média. O asterisco aponta diferença estatística significativa com $p < 0,05$.

Gráfico 2 – PANSS Psicopatologia Geral: Teste t de amostras pareadas

MNT: Mononitrato de Isossorbida, PANSS: Escala de Avaliação das Síndromes Positiva e Negativa para Esquizofrenia. Semana 2: $t = 2,82$; $gl = 20$; $p < 0,11$. Semana 3: $t = 3,05$; $gl = 20$; $p < 0,006$. Semana 4: $t = 2,84$; $gl = 19$; $p < 0,01$. As barras verticais indicam o erro padrão da média. O asterisco aponta diferença estatística significativa com $p < 0,05$.

4.1.3. Escore de Sintomas Positivos da PANSS

A análise de medidas repetidas não demonstrou diferenças entre os grupos que dependessem da ordem de início, porém detectou mudanças significativas entre o período em uso de placebo e o período em uso de MNT; $F_{8,144} = 5,24$ ($p < 0,001$). O teste t de amostras pareadas está representado no Gráfico 3. Observa-se que a partir da terceira semana o grupo em uso de MNT apresenta um escore inferior ao grupo em uso de placebo.

Gráfico 3 – PANSS Positiva: Teste t de amostras pareadas

Semana 3: $t = 2,14$; $gl = 20$; $p < 0,045$. Semana 4: $t = 2,6$; $gl = 19$; $p < 0,018$. MNT: Mononitrato de Isossorbida, PANSS: Escala de Avaliação das Síndromes Positiva e Negativa para Esquizofrenia. As barras verticais indicam o erro padrão da média. O asterisco aponta diferença estatística significativa com $p < 0,05$.

4.1.4. Escala de Sintomas Negativos da PANSS

Houve diferenças entre os grupos na linha de base; o grupo que iniciou com placebo apresentou um escore maior e, nesse caso, houve efeito de ordem. Portanto, não foi possível continuar com a análise estatística.

4.2. ESCALA DE IMPRESSÃO CLÍNICA GLOBAL

A CGI é uma escala ordinal de avaliação clínica, foram realizados testes não-paramétricos controlados pela ordem de início, placebo ou MNT, para avaliar se houve impacto na adição da droga (Gráfico 4).

Gráfico 4 – Análise não-paramétrica da CGI

Teste de Friedman. Qui-quadrado = 44,59; gl = 8; $p < 0,01$. As barras verticais indicam o erro padrão da média. O asterisco aponta diferença estatística significativa com $p < 0,05$.

A partir da segunda semana do MNT, independentemente do grupo de início, os escores foram inferiores em relação às semanas em uso do placebo. A análise de medidas repetidas também evidenciou diferenças entre as semanas, que foram independentes da ordem de início ($F_{8, 144} = 1,41$; $p < 0,001$).

4.3. ESCALA DE AVALIAÇÃO FUNCIONAL

A GAF é uma escala clínica de funcionamento global em que quanto maior o escore, melhor está o paciente quanto aos sintomas e à realização de atividades diárias. Não houve

diferenças quanto à ordem de início dos pacientes e que houve mudanças estatisticamente significativas no decorrer do estudo ($F_{8, 136} = 2,71$; $p < 0,008$).

Após a análise de medidas repetidas evidenciar significância, o teste t entre as semanas de uso do placebo e as semanas de uso do MNT foi aplicado. Houve benefício em favor do MNT a partir da terceira semana, apesar de permanecer apenas uma tendência na quarta semana (Gráfico 5).

Gráfico 5 – Análise da GAF: Teste t de amostras pareadas

Semana 3: $t = -2,45$; $gl = 20$; $p < 0,024$. Semana 4: $t = -1,96$; $gl = 19$; $p < 0,06$. GAF: Escala de Avaliação Funcional, MNT: Mononitrato de Isossorbida. As barras verticais indicam o erro padrão da média. O asterisco aponta diferença estatística significativa com $p < 0,05$.

4.4. BATERIA COGNITIVA CONSENSUAL MATRICS

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre placebo e MNT em nenhum dos domínios cognitivos da MCCB. Houve melhora significativa em ambos os grupos, sugerindo provável efeito de aprendizagem para os dois grupos, indistintamente, nos domínios Memória de Trabalho ($F_{2, 36} = 7,46$; $p < 0,002$) e Velocidade de Processamento ($F_{2, 36} = 6,26$; $p < 0,005$). Nos outros cinco domínios não houve este efeito e nem diferenças entre os grupos.

Na Pontuação Composta Geral, que é um média de todos os domínios, também houve efeito de aprendizagem ($F_{2, 42} = 3,88$; $p < 0,03$).

4.5. NEUROIMAGEM FUNCIONAL

Foi encontrada uma redução estatisticamente significativa do CBF no tálamo direito do grupo 1 após MNT (comparado ao grupo 1 + grupo 2 no início do estudo ($p = 0,04$, não corrigido) e no tálamo direito ($p = 0,04$, não corrigido) e no giro angular direito ($p = 0,04$, não corrigido) no grupo 2 também comparado ao grupo 1 + grupo 2 na linha de base.

Na comparação dentro do grupo, o CBF do grupo 1 aumentou no hipocampo esquerdo após placebo ($p = 0,03$, não corrigido) e diminuiu no tálamo direito ($p = 0,00005$, corrigido para múltiplas comparações) e na amígdala direita ($p = 0,03$, não corrigido) após MNT. O CBF do grupo 2 aumentou no giro angular esquerdo após MNT ($p = 0,03$, não corrigido) e diminuiu no DLPFC direito ($p = 0,02$, não corrigido) e no giro supra-marginal direito ($p = 0,01$, não corrigido).

Uma comparação *post hoc* foi realizada entre o grupo 1 e o grupo 2, a fim de descobrir os possíveis motivos que justificaram as diferenças na comparação dentro do grupo. O grupo 1 apresentava CBF aumentado no tálamo direito ($p = 0,02$, não corrigido) e na amígdala direita ($p = 0,04$, não corrigido) quando comparado ao grupo 2 na linha de base.

4.6. SEGURANÇA

Não houve eventos adversos graves relatados durante o estudo. Os efeitos adversos medidos com UKU mostraram diferenças significativas nas taxas de dores de cabeça relatadas (leves a moderadas) na primeira ($p < 0,046$) e na segunda ($p < 0,04$) semanas de uso do MNT. Nenhum outro evento adverso foi relatado ou foi estatisticamente significativo nas outras semanas (relato de dor de cabeça: terceira semana, $p < 0,079$; quarta semana, $p < 0,29$).

5. DISCUSSÃO

A esquizofrenia, persiste como um dos maiores desafios da psiquiatria, assim como da medicina. Foi demonstrado por vários estudos que uma proporção significativa de pacientes com esquizofrenia apresenta resposta parcial ou não apresentam resposta ao tratamento habitual com antipsicóticos. A falência do tratamento é mais pronunciada quando levados em consideração os sintomas negativos e os sintomas cognitivos, contudo também é significativa para os sintomas positivos (FOUSSIAS; REMINGTON, 2010; KIRKPATRICK et al., 2006). Esse tem sido um dos principais motivos que justificam a busca por novos tratamentos, sejam em monoterapia ou como adjuvantes. Diante deste contexto, este estudo teve o objetivo de investigar os efeitos da associação de MNT de liberação prolongada na dose mínima diária (50mg ao dia) ao tratamento farmacológico de pacientes com esquizofrenia que persistiam sintomáticos apesar do tratamento otimizado. A hipótese primeira da pesquisa era de que o MNT seria capaz de atenuar os sintomas positivos, negativos e cognitivos em consequência da ativação da via “NMDA-NO-GMPc”, bem como das outras vias do NO, o que seria evidenciado através da redução de escores nas escalas PANSS e CGI, e do aumento de escores na bateria cognitiva MCCB e da GAF.

O MNT 50mg/dia mostrou-se seguro, sendo cefaleia leve ou moderada o único efeito adverso relatado pelos pacientes e identificado através da aplicação repetida da escala UKU. Além de ser o único efeito adverso relatado, houve remissão em todos os casos de cefaleia com administração de paracetamol e nenhum sujeito se retirou ou teve que ser excluído do estudo devido a este efeito.

Foram encontradas reduções estatisticamente significativas nos escores de todas as escalas clínicas aplicadas, exceto na PANSS negativa, que não pôde ser avaliada, o que é compatível com a hipótese inicial de que os doadores de NO são capazes de reduzir sintomas nos pacientes com esquizofrenia. A PANSS total representa a soma das três sub-escalas—positiva, negativa e geral. Nesta, houve redução média de 2,65 pontos em relação ao placebo, o que é bem modesto, numericamente. Na PANSS geral, a redução média foi de 1,5 pontos em relação ao placebo, o que é suficiente para retirar o paciente de um sintoma moderado para um leve. Os resultados foram significativos a partir da segunda semana. A PANSS positiva mostrou-se reduzida em média 1,15 pontos nos pacientes em uso de MNT em relação ao período em uso do placebo.

Na CGI e na GAF também foram encontrados resultados em consonância com os da PANSS, estatisticamente significativos e com impacto numérico modesto. A PANSS, como é bem sabido, é usada para avaliar mudanças na gravidade da psicopatologia dos pacientes. Contudo as implicações clínicas dessas alterações, muitas vezes, não são facilmente interpretadas pelo clínico. Por exemplo, o que significa um escore de 100 pontos na PANSS Total? O que aconteceu com o paciente após uma redução de 15% nos sintomas? Uma das formas de mitigar essa dificuldade é utilizar a PANSS com escalas intuitivas para os clínicos, como a CGI, que é um instrumento capaz de avaliar a gravidade do paciente com uma pergunta simples e com uma resposta que varia de “normal” a “entre os doentes mais graves”. A GAF foi escolhida para avaliar, semanalmente, mudanças na funcionalidade do paciente, e também é uma escala intuitiva, de fácil aplicação e compreensão pelo clínico. Estudos psicométricos e clínicos apontam para uma relação entre a PANSS, a CGI e a GAF, e sugerem que o uso desta última para avaliar a funcionalidade é possível quando em conjunto com as outras duas (SUZUKI et al., 2015). Em pacientes graves e refratários, qualquer melhora clínica é percebida pelos familiares e pelos próprios pacientes e atividades simples como voltar a andar de *skate*, ajudar a lavar a louça ou tomar banho sem necessidade de auxílio, representam poucos pontos nos itens das escalas, porém são mudanças significativas em pacientes que há anos não as realizavam. Os familiares e os pacientes trouxeram esse relatos durante o período da pesquisa e, no período do placebo, muitas vezes diziam: “voltou tudo ao que era antes, doutor”.

Em relação ao testes cognitivos, os pacientes não apresentaram incrementos no desempenho após o uso do MNT. Como os sujeitos do atual ensaio possuíam uma idade média alta, muitos já haviam saído da escola há vários anos e não exerciam quaisquer atividades intelectuais. O escore composto, que é a média dos 10 testes cognitivos, de todos os pacientes foi pontuado pelo software da MCCB como abaixo do percentil cinco, o que evidencia um baixo funcionamento cognitivo. Isso não impediu que ambos os grupos apresentasse uma pequena melhora no desempenho durante o ensaio, apesar de persistirem abaixo do percentil cinco. Até o momento da confecção dessa tese, apenas um ensaio clínico fora capaz de demonstrar efeitos procognitivos detectados pela MCCB em pacientes com esquizofrenia, especificamente em um subgrupo de não fumantes (HAIG et al., 2016). A MCCB foi concebida para ser o “padrão ouro” na avaliação cognitiva de pacientes com esquizofrenia, contudo algumas críticas são válidas: o teste é longo e cansativo (podendo chegar, em alguns casos do atual ensaio, a 3h de administração), o que pode levar a alguns pacientes passarem a dar respostas “no automático” e a dependerem de estímulos motivacionais do examinador. Além disso, muitos pacientes

necessitam de uma minuciosa orientação para entender e realizar os testes, Essas e outras críticas já haviam sido pontuadas por Pietrzak et al. em 2009. Pode-se considerar, então, que conclusões não podem ser tomadas em relação aos efeitos cognitivos do MNT.

Durante a execução do atual ensaio clínico, três novos ensaios randomizados e controlados utilizando o nitroprussiato de sódio foram publicados além do pioneiro já citado. Nos resultados publicados por Stone et al. em 2016, não foram encontrados efeitos terapêuticos do nitroprussiato de sódio nos pacientes avaliados. Apesar de o estudo utilizar o mesmo protocolo de infusão realizado em 2013 por Hallak et al., algumas diferenças metodológicas podem ser ressaltadas: no estudo de 2016, os 20 pacientes incluídos apresentavam sintomas negativos mais leves (escore da PANNS negativa de 20,7 vs 30,0 pontos), eram mais velhos (34,0 vs 25,5 anos) e tinham maior duração do transtorno (14,5 vs 3,0 anos). Além disso, foram incluídos pacientes com diagnóstico de transtorno esquizoafetivo, tabagistas pesados, usuários de THC e em uma maioria de negros britânicos. Ressalta-se, também, o achado de alterações hemodinâmicas, como a redução significativa da pressão arterial e o aumento da frequência cardíaca, o que não foi relatado no trabalho de Hallak et al.

Em 2018, um artigo foi publicado por Wang et al. relatando um ensaio clínico realizado em 42 pacientes durante reagudização de sintomas. Os pacientes apresentavam características semelhantes aos do estudo de Stone et al., contudo foram excluídos tabagistas e usuários de THC e duas infusões de quatro horas foram realizadas. O desempenho cognitivo foi avaliado utilizando a Escala de Inteligência de Weschler e os sintomas psiquiátricos foram quantificados através da PANSS. Os pacientes incluídos eram mais velhos (30,5 vs 25,5 anos), com sintomas negativos mais leves (23,7 vs 30,0 pontos), com tempo de doença mais longo (7,52 vs 3,0 anos) e eram todos chineses Han. A pressão diastólica caiu no grupo em uso de nitroprussiato de sódio. É importante salientar que o ajuste das doses de antipsicóticos não foram controlados durante o ensaio. Nenhum efeito terapêutico foi relatado.

O terceiro estudo publicado, foi um ensaio randomizado, controlado por placebo, duplo-cego e multicêntrico, também avaliando o uso de nitroprussiato de sódio em 52 pacientes com esquizofrenia, publicado por Brown et al. em 2019. Nenhum efeito foi encontrado nas medidas utilizadas. Assim como nos outros ensaios, os pacientes eram mais velhos (47,1 vs 25,5 anos) e apresentavam menos sintomas negativos (20,9 vs 30,0 pontos). A pressão diastólica caiu significativamente durante o uso do nitroprussiato de sódio. O tempo de doença não foi relatado (Tabela 5).

Tabela 5 – Doadores de Óxido Nítrico em pacientes com esquizofrenia: resultados e características de ensaios clínicos randomizados publicados

	Idade (média)	Tempo de Doença (anos)	PANNS Negativa (escore)	Clozapina (em uso/ total)	Tabagismo (em uso/ total)	Resultados
Hallak et al., 2013	25,5	2,85	30,0	0 (20)	0 (20)	Positivo
Stone et al., 2016	34,0	12,0	21,4	6 (20)	12 (20)	Negativo
Wang et al., 2018	30,5	7,52	23,0	18 (42)	0 (42)	Negativo
Brown et al., 2019	47,1	na	20,9	20 (52)	20 (52)	Negativo
Ensaio Atual	34,7	14,87	24,5	20 (24)	3 (24)	Positivo para todas as medidas, exceto PANSS negativa e MCCB

MCCB: Bateria Cognitiva Consensual MATRICS, PANSS: Escala de Avaliação das Síndromes Positiva e Negativa para Esquizofrenia. na = não avaliado.

Os pacientes no atual ensaio realizado por nosso grupo apresentaram algumas características que se assemelham aos estudos com resultados negativos e características que se assemelham ao estudo publicado por Hallak et al. em 2013 e por Maia-de-Oliveira em 2015. Como nestes últimos, os pacientes não pertenciam a nenhuma etnia específica, em sua grande maioria não eram tabagistas e apresentavam os escores de sintomas negativos maiores que nos outros três ensaios. Por outro lado, o tempo de doença foi o maior dentre todos os ensaios clínicos randomizados e a idade média cerca de 10 anos maior que no estudo de Hallak et al. Uma característica singular do trabalho aqui descrito é a alta taxa de pacientes em uso de Clozapina (20 dos 24 sujeitos que iniciaram o estudo). Além de avaliados os efeitos do MNT pela primeira vez na esquizofrenia através de escalas psicométricas e da bateria cognitiva MCCB, também foram avaliados, de forma inédita, os efeitos do fármaco no CBF através do pCASL. Em uma comparação post-hoc do grupo que iniciou com o placebo (grupo 1) — braço com sintomas negativos e cognitivos mais graves — o CBF no tálamo foi reduzido significativamente na fase de uso do MNT. O tálamo é considerado uma região cerebral de alta ordem que integra a rede central executiva que envolve os córtices pré-frontais, cingulados e parietais. Em conjunto, essas regiões estão associadas à memória de trabalho e às funções executivas (NIENDAM et al., 2012). Vários estudos corroboram os achados de atividade talâmica aumentada, principalmente em pacientes crônicos e com alta exposição a antipsicóticos (ANDREASEN et al., 1997; SCHEEF et al., 2010; ZHU et al., 2015).

Existem algumas peculiaridades concernentes aos pacientes selecionados no ensaio atual. Estes foram randomizados dos ambulatorios de esquizofrenia do HCFMRP-USP e representam uma amostra de aproximadamente 5% do serviço. São pacientes estabilizados, em tratamento ambulatorial, porém graves. Cerca de 85% dos sujeitos eram refratários e estavam em uso de clozapina. Isso significa que não responderam a dois ensaios terapêuticos prévios. Dos refratários, cerca de 50% eram super-refratários — i.e., não responderam à clozapina e estavam em uso de potencializadores não-antipsicóticos (lamotrigina) ou em associação de dois antipsicóticos. No ensaio clínico atual, foi utilizado um dos critérios de inclusão a presença de qualquer sintoma positivo ou negativo com escores maior ou igual a quatro na PANSS, e o MNT foi avaliado como uma terapia adjuvante ou potencializadora. Devido ao exposto acima, os critérios de remissão frequentemente utilizados, a saber: redução de 25–50% na PANSS ou na BPRS, não se aplicam ao nosso caso (LEUCHT, 2014). Por exemplo, se um paciente tivesse um delírio persecutório como único sintoma clinicamente significativo ainda presente, com escore quatro na PANSS Positiva, e houvesse redução de apenas um ponto durante o ensaio, estaria-se longe do critério de remissão, porém o paciente deixaria de preencher os critérios de inclusão para o ensaio.

A quase totalidade dos ensaios clínicos realizados em pacientes crônicos — estes, em sua grande maioria, com maior tempo de duração da doença e mais velhos — com esquizofrenia lidam com a questão dos sintomas negativos e cognitivos refratários, o que não foi diferente no ensaio atual, nem nos outros ensaios citados que envolveram o NO. Pacientes com esse perfil estão em tratamento e esforços não podem ser poupados para o aumento de seu bem-estar. Contudo, os avanços atuais, de forma semelhante à pesquisa realizada por Hallak et al. em 2013, que priorizou casos recentes, apontam para a intervenção precoce como uma das formas mais eficazes de se modificar o curso do transtorno (CORRELL et al., 2018). Os pacientes do estudo de Hallak et al. eram jovens e estavam nos primeiros anos após o primeiro episódio psicótico, o que levou a um significativo impacto clínico mediado por uma ação na via do NO que antecedeu ao período de cronificação e refratariedade, de forma diferente do que aconteceu nos outros ensaios clínicos descritos.

As diferenças de achados entre pacientes crônicos e pacientes com pouco tempo de doença nos estudos de neuroimagem estrutural e funcional estão em congruência com os ensaios clínicos. Pacientes em primeiro episódio psicótico apresentam alterações estruturais em menor magnitude e extensão que os pacientes crônicos, apesar da progressão limitada das alterações, de maneira diferente do que ocorre nas demências, que são degenerativas. O

principal achado em pacientes com pouco tempo de doença é a redução do volume cortical nos lobos frontais e temporais associada a aumento no volume dos ventrículos laterais. Nos pacientes crônicos, alterações em regiões dos lobos frontais, temporais, parietais e em estruturas subcorticais estão presentes (HAIJMA et al., 2013). Diferenças entre pacientes crônicos e pacientes com pouco tempo de doença da mesma forma são evidenciadas nos estudos de neuroimagem funcional. Há espriamento de regiões afetadas com o passar do tempo de doença, sendo o aumento da conectividade e da atividade talâmica a principal diferença encontrada entre os grupos (LI et al., 2016).

Pode-se levantar a hipótese, então, de que, apesar das evidências que reforçam a relevância do NO e o papel de seus doadores na fisiopatologia e no tratamento da esquizofrenia, os efeitos de se intervir no sistema nitrérgico podem se mostrar reduzidos com a cronificação do transtorno. Isso é capaz de explicar os resultados negativos de parte dos ensaios clínicos com nitroprussiato de sódio assim como os efeitos limitados do ensaio atual.

A clozapina é um antipsicótico consagrado pela clínica para os casos de esquizofrenia refratária, apesar disso, muitas dúvidas permeiam seu mecanismo de ação. Existem evidências de que a clozapina possui atividades nitrérgicas e glutamatérgicas. Em um modelo animal, foi demonstrado por Bringas et al. que a clozapina agiu como moduladora dos níveis cerebrais de NO em ratos, além de ter revertido déficits comportamentais e atrofia neuronal. Em um estudo *in vitro* recém-publicado foi encontrado que a clozapina atuou como reguladora da atividade glutamatérgica na via tálamo-cortical ao agir em receptores de glutamato pré-sinápticos e em receptores de glutamato localizado nos astrócitos (FUKUYAMA et al., 2019). A clozapina também é capaz de atenuar os efeitos da fenciclidina, um antagonista dos receptores NMDA, em núcleos talâmicos de ratos (SANTANA et al., 2011). Os modestos incrementos encontrados no ensaio atual podem ser creditados a um efeito sinérgico do MNT com a clozapina, tendo em vista que 20 dos 23 pacientes que completaram o ensaio estavam em uso desse fármaco. Além disso, no grupo com sintomas negativos e cognitivos mais graves, onde apenas um dos sujeitos não estava em uso de clozapina, foi evidenciada uma redução significativa da atividade talâmica após uso do mononitrato, o que está em consonância com os achados acima citados.

LIMITAÇÕES

Podem ser enumeradas importantes limitações no delineamento e na interpretação dos resultados do estudo ora apresentado. O pequeno tamanho da amostra e a ausência da realização conjunta em outros centros são pontos relevantes. Uma amostra maior aumentaria o poder de generalização e a realização do estudo em outros centros avaliaria os efeitos do fármaco em outros contextos culturais e clínicos. Como a cefaleia foi o único efeito adverso relatado, pode ter havido influência na eficácia do cegamento, pois tanto o avaliador como o paciente foram informados de que esse era o efeito adverso mais comum.

É intrínseco ao estudo cruzado a ausência de controles saudáveis, então, por exemplo, a redução na atividade talâmica não significa que essa região estava hiperativada, ela poderia estar hipoativada previamente e ter sua atividade ainda mais reduzida após o acréscimo da droga em avaliação.

Além disso, os resultados obtidos não alcançaram os padrões de resposta ou remissão considerados em estudos clássicos de pacientes com esquizofrenia. Também é digno de nota o fato de o efeito da droga ter se perdido na quarta semana quando avaliado pela GAF, o que pode significar desenvolvimento de tolerância ao nitrato.

7. CONCLUSÕES

O atual ensaio realizado com o MNT foi o primeiro a avaliar esse fármaco em um grupo de pacientes com esquizofrenia e também foi o primeiro a fazer essa avaliação em conjunto com a MCCB e com uma técnica não invasiva de aferição do CBF, a RNM utilizando o ASL. Baseado nos achados do presente ensaio clínico, ressalta-se a impossibilidade de análise estatística dos sintomas negativos — avaliados segundo os escores de sintomas negativos da PANSS — e a ausência de efeitos nos sintomas cognitivos — aferidos conforme pontuação da MCCB — apesar das críticas em relação a este último achado. Pode ser considerado que a dose de 50mg de MNT em liberação prolongada administrada pelo período de um mês apresenta efeito positivo em pacientes crônicos, refratários e em uso de clozapina que persistem com sintomas clinicamente significativos apesar do tratamento otimizado — de acordo com os escores da PANSS total, da PANSS positiva, da PANSS geral e da CGI. Quanto ao efeitos no padrão de ativação cerebral, foi evidenciada redução na atividade talâmica no grupo de pacientes mais graves após uma análise *post hoc* das neuroimagens obtidas através do ASL. Além disso, os pacientes apresentaram uma melhora significativa da funcionalidade durante a terceira semana do tratamento de acordo com a GAF. Quanto aos efeitos adversos, o MNT mostrou-se um fármaco seguro conforme padronizado na UKU.

REFERÊNCIAS ¹

- ABRAMS, J. How to use nitrates. **Cardiovascular drugs and therapy / sponsored by the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy**, v. 16, p. 511–514, 2002.
- ABSHAGEN, U. W. Pharmacokinetics of isosorbide mononitrate. **The American journal of cardiology**, v. 70, n. 17, p. 61G-66G, 27 nov. 1992.
- ALSOP, D. C. et al. Recommended implementation of arterial spin-labeled perfusion MRI for clinical applications: A consensus of the ISMRM perfusion study group and the European consortium for ASL in dementia. **Magnetic Resonance in Medicine**, v. 73, n. 1, p. 102–116, 1 jan. 2015.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION (ED.). **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders**. fourth ed ed. Washington D.C: [s.n.].
- ANDREASEN, N. C. et al. Hypofrontality in schizophrenia: distributed dysfunctional circuits in neuroleptic-naïve patients. **Lancet (London, England)**, v. 349, n. 9067, p. 1730–4, 14 jun. 1997.
- ASGHAR, M. S. Effects of glyceryl trinitrate and calcitonin gene-related peptide on BOLD signal and arterial diameter: methodological studies by fMRI and MRA. **Danish medical journal**, v. 59, p. B4489, 2012.
- AUGUST, S. M. et al. The MATRICS Consensus Cognitive Battery (MCCB): clinical and cognitive correlates. **Schizophrenia research**, v. 134, n. 1, p. 76–82, jan. 2012.
- BELL, D. S. Comparison of amphetamine psychosis and schizophrenia. **The British journal of psychiatry : the journal of mental science**, v. 111, p. 701–707, 1965.
- BENNETT, E. D.; DAVIS, A L. A haemodynamic and pharmacokinetic study to assess a new transdermal nitroglycerin preparation in normal subjects. **European journal of clinical pharmacology**, v. 26, n. 3, p. 293–6, jan. 1984.
- BERNSTEIN, H.-G. et al. Nitric oxide and schizophrenia: present knowledge and emerging concepts of therapy. **CNS & neurological disorders drug targets**, v. 10, n. 7, p. 792–807, nov. 2011.
- BERNSTEIN, H.-G.; BOGERTS, B.; KEILHOFF, G. The many faces of nitric oxide in schizophrenia. A review. **Schizophrenia research**, v. 78, p. 69–86, 2005.
- BIRNBAUM, R. et al. Prenatal Expression Patterns of Genes Associated With Neuropsychiatric Disorders. **American Journal of Psychiatry**, v. 171, n. 7, p. 758–767, jul. 2014.
- BLACK, M. D.; MATTHEWS, E. K.; HUMPHREY, P. P. The effects of a photosensitive nitric oxide donor on basal and electrically-stimulated dopamine efflux from the rat striatum in vitro. **Neuropharmacology**, v. 33, p. 1357–1365, 1994.
- BLISS, T. V; COLLINGRIDGE, G. L. A synaptic model of memory: long-term potentiation

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).

in the hippocampus. **Nature**, v. 361, p. 31–39, 1993.

BODE-BÖGER, S. M.; KOJDA, G. Organic nitrates in cardiovascular disease. **Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)**, v. 51, p. 307–320, 2005.

BOROGOVAC, A.; ASLLANI, I. Arterial Spin Labeling (ASL) fMRI: advantages, theoretical constraints, and experimental challenges in neurosciences. **International journal of biomedical imaging**, v. 2012, p. 818456, jan. 2012.

BRAMON, E. et al. Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci. **Nature**, v. 511, n. 7510, p. 421–427, 22 jul. 2014.

BREDT, D. S.; SNYDER, S. H. Nitric oxide, a novel neuronal messenger. **Neuron**, v. 8, p. 3–11, 1992.

BRINGAS, M. E. et al. Clozapine administration reverses behavioral, neuronal, and nitric oxide disturbances in the neonatal ventral hippocampus rat. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 4, p. 1848–1857, mar. 2012.

BROWN, H. E. et al. Efficacy and Tolerability of Adjunctive Intravenous Sodium Nitroprusside Treatment for Outpatients With Schizophrenia. **JAMA Psychiatry**, 2019.

BUCHANAN, R. W. et al. The Cognitive and Negative Symptoms in Schizophrenia Trial (CONSIST): the efficacy of glutamatergic agents for negative symptoms and cognitive impairments. **The American journal of psychiatry**, v. 164, n. 10, p. 1593–602, out. 2007.

BUJAS-BOBANOVIC, M. et al. Blockade of phencyclidine-induced effects by a nitric oxide donor. **Br J Pharmacol**, v. 130, p. 1005–1012, 2000.

BUJAS-BOBANOVIC, M.; ROBERTSON, H. A.; DURSUN, S. M. Effects of nitric oxide synthase inhibitor N(G)-nitro-L-arginine methyl ester on phencyclidine-induced effects in rats. **European journal of pharmacology**, v. 409, n. 1, p. 57–65, 1 dez. 2000.

CHEITLIN, M. D. Should the patient with coronary artery disease use sildenafil? **Preventive cardiology**, v. 6, n. 3, p. 161–5, jan. 2003.

CLOUTIER, M. et al. The economic burden of schizophrenia in the United States in 2013. **The Journal of clinical psychiatry**, 26 abr. 2016.

CORRELL, C. U. et al. Comparison of Early Intervention Services vs Treatment as Usual for Early-Phase Psychosis: A Systematic Review, Meta-analysis, and Meta-regression. **JAMA psychiatry**, v. 75, n. 6, p. 555–565, 2018.

DALMAU, J. et al. Anti-NMDA-receptor encephalitis: case series and analysis of the effects of antibodies. **Lancet neurology**, v. 7, p. 1091–1098, 2008.

DALMAU, J. et al. Clinical experience and laboratory investigations in patients with anti-NMDAR encephalitis. **Lancet neurology**, v. 10, n. 1, p. 63–74, jan. 2011.

DAVIDSON, L. L.; HEINRICHS, R. W. Quantification of frontal and temporal lobe brain-imaging findings in schizophrenia: a meta-analysis. **Psychiatry research**, v. 122, n. 2, p. 69–87, 15 fev. 2003.

DEAKIN, J. F.; SIMPSON, M. D. A two-process theory of schizophrenia: evidence from

- studies in post-mortem brain. **Journal of psychiatric research**, v. 31, n. 2, p. 277–95, 1997.
- DEL-BEN, C. M. et al. Test-retest reliability of the Structured Clinical Interview for DSM-IV - Clinical Version (SCID-CV) translated into portuguese. **Revista brasileira de psiquiatria**, v. 23, p. 156–9, 2001.
- FERNÁNDEZ-TOMÉ, P. et al. Neuroprotective effects of DETA-NONOate, a nitric oxide donor, on hydrogen peroxide-induced neurotoxicity in cortical neurones. **Neuropharmacology**, v. 38, p. 1307–1315, 1999.
- FONSECA, A. O. et al. The Brazilian standardization of the MATRICS consensus cognitive battery (MCCB): Psychometric study. **Schizophrenia Research**, v. 185, p. 148–153, jul. 2017.
- FOUSSIAS, G.; REMINGTON, G. Antipsychotics and schizophrenia: from efficacy and effectiveness to clinical decision-making. **Canadian journal of psychiatry. Revue canadienne de psychiatrie**, v. 55, n. 3, p. 117–25, mar. 2010.
- FROMER, M. et al. De novo mutations in schizophrenia implicate synaptic networks. 2014.
- FUKUYAMA et al. Clozapine Normalizes a Glutamatergic Transmission Abnormality Induced by an Impaired NMDA Receptor in the Thalamocortical Pathway via the Activation of a Group III Metabotropic Glutamate Receptor. **Biomolecules**, v. 9, n. 6, p. 234, 17 jun. 2019.
- GOTTESMAN, I. I. et al. Severe Mental Disorders in Offspring With 2 Psychiatrically Ill Parents. **Archives of General Psychiatry**, v. 67, n. 3, p. 252, 1 mar. 2010.
- GRAY, B. E. et al. Detecting reliable cognitive change in individual patients with the MATRICS Consensus Cognitive Battery HHS Public Access. **Schizophr Res**, v. 159, n. 1, p. 182–187, 2014.
- GRIZZLE, J. E. The Two-Period Change-Over Design and Its Use in Clinical Trials. **Biometrics**, v. 21, n. 2, p. 467, jun. 1965.
- GUIMARÃES, T. M. et al. Arterial spin labeling in patients with schizophrenia: a systematic review. **Archives of Clinical Psychiatry (São Paulo)**, v. 43, n. 6, p. 151–156, dez. 2016.
- GUY, W. Clinical global impressions. In: GUY, W. (Ed.). **ECDEU assessment manual for psychopharmacology (Revised) National Institute of Mental Health**. Rockville, Maryland: [s.n.]. p. 217–221.
- HAIG, G. M. et al. A randomized trial to assess the efficacy and safety of ABT-126, a selective $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor agonist, in the treatment of cognitive impairment in schizophrenia. **American Journal of Psychiatry**, v. 173, n. 8, p. 827–835, 2016.
- HAIJMA, S. V et al. Brain volumes in schizophrenia: a meta-analysis in over 18 000 subjects. **Schizophrenia bulletin**, v. 39, n. 5, p. 1129–38, set. 2013.
- HALLAK, J. E. C. et al. Rapid improvement of acute schizophrenia symptoms after intravenous sodium nitroprusside: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **JAMA psychiatry (Chicago, Ill.)**, v. 70, n. 7, p. 668–76, jul. 2013.
- HINDLEY, S. et al. Nitric oxide donors enhance neurotrophin-induced neurite outgrowth

through a cGMP-dependent mechanism. **Journal of neuroscience research**, v. 47, p. 427–439, 1997.

HJORTHØJ, C. et al. Years of potential life lost and life expectancy in schizophrenia: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet Psychiatry**, fev. 2017.

HOMAN, P. et al. Repeated measurements of cerebral blood flow in the left superior temporal gyrus reveal tonic hyperactivity in patients with auditory verbal hallucinations: a possible trait marker. **Frontiers in human neuroscience**, v. 7, n. June, p. 304, jan. 2013.

HOWES, O.; MCCUTCHEON, R.; STONE, J. Glutamate and dopamine in schizophrenia: An update for the 21 st century. **Journal of Psychopharmacology**, v. 29, n. 2, p. 97–115, 13 fev. 2015.

HUAN TAN, B. et al. **Improving the robustness of perfusion imaging with arterial spin labeling magnetic resonance imaging**. [s.l.] Wake Forest University Graduate School of Arts and Sciences, 2010.

JAFFE, A. E. et al. Mapping DNA methylation across development, genotype and schizophrenia in the human frontal cortex. **Nature Neuroscience**, v. 19, n. 1, p. 40–47, 30 jan. 2016.

JOHNSTONE, E. C. et al. Mechanism of the antipsychotic effect in the treatment of acute schizophrenia. **Lancet**, v. 1, p. 848–851, 1978.

JONES, S. H. et al. A brief mental health outcome scale. Reliability and validity of the global assessment of functioning (GAF). **British Journal of Psychiatry**, 1995.

KAHLIG, K. M. et al. Amphetamine induces dopamine efflux through a dopamine transporter channel. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, p. 3495–3500, 2005.

KANDRATAVICIUS, L. et al. Effects of nitric oxide-related compounds in the acute ketamine animal model of schizophrenia. **BMC neuroscience**, v. 16, p. 9, 2015.

KANTROWITZ, J.; JAVITT, D. Thinking Glutamatergically: Changing Concepts of Schizophrenia Based Upon Changing Neurochemical Models. **Clinical Schizophrenia & Related Psychoses**, v. 4, n. 3, p. 189–200, out. 2010.

KAY, S. R.; FISZBEIN, A.; OPLER, L. A. The positive and negative syndrome scale (PANSS) for schizophrenia. **Schizophrenia Bulletin**, 1987.

KERN, R. S. et al. The MATRICS Consensus Cognitive Battery, part 2: co-norming and standardization. **The American journal of psychiatry**, v. 165, n. 2, p. 214–20, fev. 2008.

KIRKPATRICK, B. et al. **The NIMH-MATRICS consensus statement on negative symptoms**. Schizophrenia Bulletin. **Anais...**2006

KOOYMAN, I. et al. **Outcomes of public concern in schizophrenia** **British Journal of Psychiatry**, 2007.

KOSOGLOU, T. et al. Pharmacokinetics of isosorbide-5-mononitrate after oral administration of an extended-release mononitrate formulation versus a standard dinitrate formulation. **Clinical therapeutics**, v. 17, n. 2, p. 241–51, 1995.

KRAMER, J. C.; FISCHMAN, V. S.; LITTLEFIELD, D. C. Amphetamine abuse. Pattern and effects of high doses taken intravenously. **JAMA : the journal of the American Medical Association**, v. 201, p. 305–309, 1967.

LESLIE, R. A.; JAMES, M. F. Pharmacological magnetic resonance imaging: a new application for functional MRI. **Trends in pharmacological sciences**, v. 21, p. 314–318, 2000.

LEUCHT, S. et al. How effective are second-generation antipsychotic drugs? A meta-analysis of placebo-controlled trials. **Molecular Psychiatry**, v. 14, n. 4, p. 429–447, 8 abr. 2009.

LEUCHT, S. Measurements of Response, Remission, and Recovery in Schizophrenia and Examples for Their Clinical Application. **The Journal of Clinical Psychiatry**, v. 75, n. suppl 1, p. 8–14, fev. 2014.

LEWIS, D. A.; LEVITT, P. Schizophrenia as a disorder of neurodevelopment. **Annual review of neuroscience**, v. 25, p. 409–32, jan. 2002.

LI, T. et al. Brain-Wide Analysis of Functional Connectivity in First-Episode and Chronic Stages of Schizophrenia. **Schizophrenia Bulletin**, v. 43, n. 2, p. sbw099, 21 jul. 2016.

LIANG, N. Y.; RUTLEDGE, C. O. Evidence for carrier-mediated efflux of dopamine from corpus striatum. **Biochemical pharmacology**, v. 31, n. 15, p. 2479–84, 1 ago. 1982.

LICHTENSTEIN, P. et al. Common genetic determinants of schizophrenia and bipolar disorder in Swedish families: a population-based study. **Lancet (London, England)**, v. 373, n. 9659, p. 234–9, 17 jan. 2009.

LINDSLEY, C. W. et al. Progress towards validating the NMDA receptor hypofunction hypothesis of schizophrenia. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 6, p. 771–785, 2006.

LINGJAERDE, O. et al. The UKU side effect rating scale. A new comprehensive rating scale for psychotropic drugs and a cross-sectional study of side effects in neuroleptic-treated patients. **Acta psychiatrica Scandinavica. Supplementum**, v. 334, p. 1–100, jan. 1987.

LIPSKA, B. K.; JASKIW, G. E.; WEINBERGER, D. R. Postpubertal emergence of hyperresponsiveness to stress and to amphetamine after neonatal excitotoxic hippocampal damage: a potential animal model of schizophrenia. **Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 9, p. 67–75, 1993.

LONART, G.; WANG, J.; JOHNSON, K. M. Nitric oxide induces neurotransmitter release from hippocampal slices. **European journal of pharmacology**, v. 220, p. 271–272, 1992.

LUBY, E. D. et al. Study of a new schizophrenomimetic drug; sernyl. **A. M. A. archives of neurology and psychiatry**, v. 81, p. 363–369, 1959.

MACDONALD, M. L. et al. Selective Loss of Smaller Spines in Schizophrenia. **American Journal of Psychiatry**, v. 174, n. 6, p. 586–594, 1 jun. 2017.

MAIA-DE-OLIVEIRA, J. P. et al. The Effects of Sodium Nitroprusside Treatment on Cognitive Deficits in Schizophrenia. **Journal of Clinical Psychopharmacology**, v. 35, n. 1, p. 83–85, fev. 2015a.

MAIA-DE-OLIVEIRA, J. P. et al. The Effects of Sodium Nitroprusside Treatment on

Cognitive Deficits in Schizophrenia. **Journal of Clinical Psychopharmacology**, v. 35, n. 1, p. 83–85, fev. 2015b.

MARSHALL, C. R. et al. Contribution of copy number variants to schizophrenia from a genome-wide study of 41,321 subjects. **Nature genetics**, v. 49, n. 1, p. 27–35, 2017.

MAYER, B.; BERETTA, M. The enigma of nitroglycerin bioactivation and nitrate tolerance: news, views and troubles. **British journal of pharmacology**, v. 155, n. 2, p. 170–84, set. 2008.

MCGRATH, J. et al. Schizophrenia: a concise overview of incidence, prevalence, and mortality. **Epidemiologic reviews**, v. 30, p. 67–76, jan. 2008.

MELTZER, H. Y.; STAHL, S. M. The dopamine hypothesis of schizophrenia: a review. **Schizophrenia bulletin**, v. 2, n. 1, p. 19–76, jan. 1976.

MILLER, M. R.; WADSWORTH, R. M. Understanding organic nitrates--a vein hope? **British journal of pharmacology**, v. 157, p. 565–567, 2009.

MOHER, D. et al. CONSORT 2010 explanation and elaboration: Updated guidelines for reporting parallel group randomised trials q,qq. **International Journal of Surgery**, v. 10, p. 28–55, 2012.

MOORE, H.; WEST, A. R.; GRACE, A. A. The regulation of forebrain dopamine transmission: relevance to the pathophysiology and psychopathology of schizophrenia. **Biological psychiatry**, v. 46, p. 40–55, 1999.

MORTIMER, A. M. Cognitive function in schizophrenia - Do neuroleptics make a difference? **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 56, n. 4, p. 789–795, 1997.

MUESER, K. T.; MCGURK, S. R. Schizophrenia. **The Lancet**, v. 363, p. 2063–2072, 2004.

MURRAY, R. M. et al. 30 Years on: How the Neurodevelopmental Hypothesis of Schizophrenia Morphed Into the Developmental Risk Factor Model of Psychosis. **Schizophrenia bulletin**, v. 43, n. 6, p. 1190–1196, 21 out. 2017.

NIENDAM, T. A. et al. Meta-analytic evidence for a superordinate cognitive control network subserving diverse executive functions. **Cognitive, Affective, & Behavioral Neuroscience**, v. 12, n. 2, p. 241–268, 27 jun. 2012.

NONG, Y. et al. Glycine binding primes NMDA receptor internalization. **Nature**, v. 422, p. 302–307, 2003.

NORDLANDER, R.; WALTER, M. Once- versus twice-daily administration of controlled-release isosorbide-5-mononitrate 60 mg in the treatment of stable angina pectoris. A randomized, double-blind, cross-over study. The Swedish Multicentre Group. **European heart journal**, v. 15, n. 1, p. 108–13, jan. 1994.

NORRIS, D. G. Principles of magnetic resonance assessment of brain function. **Journal of Magnetic Resonance Imaging**, v. 23, p. 794–807, 2006.

NOSSAMAN, V. E.; NOSSAMAN, B. D.; KADOWITZ, P. J. Nitrates and nitrites in the treatment of ischemic cardiac disease. **Cardiology in review**, v. 18, n. 4, p. 190–7, 2010.

NUECHTERLEIN, K. H. et al. The MATRICS Consensus Cognitive Battery, part 1: test selection, reliability, and validity. **The American journal of psychiatry**, v. 165, n. February, p. 203–213, 2008.

OGILVIE, P. et al. Induction and variants of neuronal nitric oxide synthase type I during synaptogenesis. **The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 9, p. 799–806, 1995.

OLIVARI, M. T. et al. Hemodynamic and hormonal response to transdermal nitroglycerin in normal subjects and in patients with congestive heart failure. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 2, n. 5, p. 872–8, nov. 1983.

OLIVEIRA, Í. A. F. et al. Brain functional and perfusional alterations in schizophrenia: an arterial spin labeling study. **Psychiatry Research: Neuroimaging**, v. 272, n. 0, p. 71–78, fev. 2018.

OLIVEIRA, J.; ZUARDI, A.; HALLAK, J. Role of Nitric Oxide in Patients with Schizophrenia- a Systematic Review of the Literature. **Current Psychiatry Reviews**, v. 4, n. 4, p. 219–227, 1 nov. 2008.

OMAR, S. A.; ARTIME, E.; WEBB, A. J. A comparison of organic and inorganic nitrates/nitrites. **Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society**, v. 26, n. 4, p. 229–40, 15 maio 2012.

PAGE, N. A.; FUNG, H. Organic Nitrate Metabolism and Action : Toward a Unifying Hypothesis and the Future — A Dedication to Professor Leslie Z . Benet CONTRIBUTIONS OF THE BENET ' S GROUP TO THE UNDERSTANDING OF ORGANIC NITRATE. v. 102, n. 9, p. 3070–3081, 2013.

PANARIELLO, F. et al. **Age at onset in Canadian Schizophrenia patients: Admixture analysis** **Schizophrenia Research**, 2010.

PERALTA, V.; CUESTA, M. J. How many and which are the psychopathological dimensions in schizophrenia? Issues influencing their ascertainment. **Schizophrenia research**, v. 49, n. 3, p. 269–85, 30 abr. 2001.

PETERSSON, M. et al. Decreased renal sympathetic activity in response to cardiac unloading with nitroglycerin in patients with heart failure B. v. 7, p. 1003–1010, 2005.

PIETRZAK, R. H. et al. A comparison of the CogState Schizophrenia Battery and the Measurement and Treatment Research to Improve Cognition in Schizophrenia (MATRICS) Battery in assessing cognitive impairment in chronic schizophrenia. **Journal of Clinical and Experimental Neuropsychology**, v. 31, n. 7, p. 848–859, 18 set. 2009.

PILOWSKY, L. S.; KERWIN, R. W.; MURRAY, R. M. **Schizophrenia: a neurodevelopmental perspective**. **Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, 1993.

PINKHAM, A. et al. Resting quantitative cerebral blood flow in schizophrenia measured by pulsed arterial spin labeling perfusion MRI. **Psychiatry Research - Neuroimaging**, v. 194, n. 1, p. 64–72, 2011.

PITSIKAS, N.; ZISOPOULOU, S.; SAKELLARIDIS, N. Nitric oxide donor molsidomine

attenuates psychotomimetic effects of the NMDA receptor antagonist MK-801. **Journal of neuroscience research**, v. 84, p. 299–305, 2006.

POLLOCK, J. M. et al. Arterial spin-labeled MR perfusion imaging: clinical applications. **Magnetic resonance imaging clinics of North America**, v. 17, n. 2, p. 315–38, maio 2009.

PURCELL, S. M. et al. A polygenic burden of rare disruptive mutations in schizophrenia. 2014.

RAUHALA, P. et al. S-nitrosothiols and nitric oxide, but not sodium nitroprusside, protect nigrostriatal dopamine neurons against iron-induced oxidative stress in vivo. **Synapse (New York, N.Y.)**, v. 23, p. 58–60, 1996.

RAUHALA, P.; LIN, A. M.; CHIUEH, C. C. Neuroprotection by S-nitrosoglutathione of brain dopamine neurons from oxidative stress. **The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 12, p. 165–173, 1998.

REYNOLDS, G. P. Increased concentrations and lateral asymmetry of amygdala dopamine in schizophrenia. **Nature**, v. 305, n. 5934, p. 527–9, 1983.

REYNOLDS, G. P. Beyond the dopamine hypothesis. The neurochemical pathology of schizophrenia. **The British journal of psychiatry : the journal of mental science**, v. 155, p. 305–316, 1989.

RÖDER, C. H.; HOOGENDAM, J. M.; VAN DER VEEN, F. M. FMRI, antipsychotics and schizophrenia. Influence of different antipsychotics on BOLD-signal. **Current pharmaceutical design**, v. 16, p. 2012–2025, 2010.

SANTANA, N. et al. Activation of thalamocortical networks by the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist phencyclidine: reversal by clozapine. **Biological psychiatry**, v. 69, n. 10, p. 918–27, 15 maio 2011.

SCHEEF, L. et al. Resting-state perfusion in nonmedicated schizophrenic patients: a continuous arterial spin-labeling 3.0-T MR study. **Radiology**, v. 256, n. 1, p. 253–60, jul. 2010.

SEEMAN, P. et al. Antipsychotic drug doses and neuroleptic/dopamine receptors. **Nature**, v. 261, n. 5562, p. 717–9, 24 jun. 1976.

SIEGEL, R. K. Phencyclidine and ketamine intoxication: a study of four populations of recreational users. **NIDA research monograph**, n. 21, p. 119–47, ago. 1978.

SPEAKMAN, M. T.; KLONER, R. A. Viagra and Cardiovascular Disease. **J.Cardiovasc.Pharmacol.Ther.**, v. 4, p. 259–267, 1999.

STEWART, D. D. Tolerance to nitroglycerin. **JAMA : the journal of the American Medical Association**, v. 44, p. 1678–1679, 1905.

STONE, J. M. et al. The effect of sodium nitroprusside on psychotic symptoms and spatial working memory in patients with schizophrenia: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Psychological Medicine**, v. 46, n. 16, p. 3443–3450, 22 dez. 2016.

SULLIVAN, P. F.; KENDLER, K. S.; NEALE, M. C. Schizophrenia as a Complex Trait. **Archives of General Psychiatry**, v. 60, n. 12, p. 1187, 2003.

SULZER, D.; RAYPORT, S. Amphetamine and other psychostimulants reduce pH gradients in midbrain dopaminergic neurons and chromaffin granules: a mechanism of action. **Neuron**, v. 5, p. 797–808, 1990.

SUZUKI, T. et al. Relationships between global assessment of functioning and other rating scales in clinical trials for schizophrenia. **Psychiatry Research**, v. 227, n. 2–3, p. 265–269, jun. 2015.

TANDON, R. et al. Definition and description of schizophrenia in the DSM-5. **Schizophrenia Research**, v. 150, n. 1, p. 3–10, out. 2013.

TANDON, R.; KESHAVAN, M. S.; NASRALLAH, H. A. Schizophrenia, “just the facts” what we know in 2008. 2. Epidemiology and etiology. **Schizophrenia research**, v. 102, n. 1–3, p. 1–18, jul. 2008.

TANDON, R.; NASRALLAH, H. A.; KESHAVAN, M. S. Schizophrenia, “just the facts” 4. Clinical features and conceptualization. **Schizophrenia research**, v. 110, n. 1–3, p. 1–23, maio 2009.

THORNBURG, S. A.; SAKLAD, S. R. A review of NMDA receptors and the phencyclidine model of schizophrenia. **Pharmacotherapy**, v. 16, n. 1, p. 82–93, 1996.

TIENARI, P. et al. **Genetic Boundaries of the Schizophrenia Spectrum: Evidence From the Finnish Adoptive Family Study of Schizophrenia** *Am J Psychiatry*. [s.l.: s.n.].

TORU, M.; KURUMAJI, A.; ISHIMARU, M. Excitatory amino acids: implications for psychiatric disorders research. **Life sciences**, v. 55, p. 1683–1699, 1994.

TRACEY, I. Prospects for human pharmacological functional magnetic resonance imaging (phMRI). **Journal of clinical pharmacology**, v. Suppl, p. 21S–28S, jul. 2001.

TSAI, G.; LIN, P.-Y. Strategies to Enhance N-Methyl-D-Aspartate Receptor-Mediated Neurotransmission in Schizophrenia, a Critical Review and Meta-Analysis. **Current Pharmaceutical Design**, v. 16, n. 5, p. 522–537, 1 fev. 2010.

TUOMINEN, H. J.; TIIHONEN, J.; WAHLBECK, K. Glutamatergic drugs for schizophrenia: a systematic review and meta-analysis. **Schizophrenia research**, v. 72, p. 225–34, 2005.

URSINI, G. et al. Convergence of placenta biology and genetic risk for schizophrenia. **Nature Medicine**, 2018.

VESSONI, A. L. N. **Adaptação e estudo da confiabilidade da escala de avaliação das síndromes positiva e negativa para a esquizofrenia no Brasil**. [s.l.] Escola Paulista de Medicina, 1993.

WADDINGTON, J. L. Schizophrenia: developmental neuroscience and pathobiology. **Lancet**, v. 341, p. 531–536, 1993.

WALTHER, S. et al. Resting state cerebral blood flow and objective motor activity reveal basal ganglia dysfunction in schizophrenia. **Psychiatry research**, v. 192, n. 2, p. 117–24, 31 maio 2011.

WANG, X. et al. Sodium nitroprusside treatment for psychotic symptoms and cognitive deficits of schizophrenia: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Psychiatry**

Research, v. 269, p. 271–277, nov. 2018a.

WANG, X. et al. Sodium nitroprusside treatment for psychotic symptoms and cognitive deficits of schizophrenia: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Psychiatry Research**, v. 269, p. 271–277, 1 nov. 2018b.

WANG, Z. et al. Empirical optimization of ASL data analysis using an ASL data processing toolbox: ASLtbx. **Magnetic resonance imaging**, v. 26, n. 2, p. 261–9, 1 fev. 2008.

WEBER, H. et al. The genetic contribution of the NO system at the glutamatergic post-synapse to schizophrenia: Further evidence and meta-analysis. **European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology**, p. 1–21, 27 set. 2013.

WEI, J. et al. Nitrates for stable angina: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. **International journal of cardiology**, v. 146, n. 1, p. 4–12, 7 jan. 2011.

WEINBERGER, D. R. Implications of normal brain development for the pathogenesis of schizophrenia. **Archives of general psychiatry**, v. 44, p. 660–669, 1987.

WEINBERGER, D. R. On the plausibility of “the neurodevelopmental hypothesis” of schizophrenia. **Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 14, p. 1S-11S, 1996.

WINK, D. A. et al. Nitric oxide protects against cellular damage and cytotoxicity from reactive oxygen species. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, p. 9813–9817, 1993.

WINK, D. A.; MITCHELL, J. B. Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. **Free radical biology & medicine**, v. 25, p. 434–456, 1998.

WISENBERG, G. et al. Sustained effect of and lack of development of tolerance to controlled-release isosorbide-5-mononitrate in chronic stable angina pectoris. **The American journal of cardiology**, v. 64, n. 10, p. 569–76, 15 set. 1989.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The World health report : 2001 : Mental health : new understanding, new hope**. Geneva: [s.n.].

WU, H. H.; WAID, D. K.; MCLOON, S. C. Nitric oxide and the developmental remodeling of retinal connections in the brain. **Progress in brain research**, v. 108, p. 273–86, jan. 1996.

YAMADA, K. et al. The role of nitric oxide in dizocilpine-induced impairment of spontaneous alternation behavior in mice. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 276, n. 2, p. 460–6, mar. 1996.

ZERBIN-RÜDIN, E.; KENDLER, K. S. Ernst Rüdin (1874–1952) and his genealogic-demographic department in Munich (1917–1986): An introduction to their family studies of schizophrenia. **American Journal of Medical Genetics**, v. 67, n. 4, p. 332–337, 26 jul. 1996.

ZHU, J. et al. Altered resting-state cerebral blood flow and its connectivity in schizophrenia. **Journal of Psychiatric Research**, v. 63, p. 28–35, abr. 2015.

APÊNDICE A

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.
Voluntário portador de esquizofrenia

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

NOME DA PESQUISA: Efeito da adição de mononitrato, um doador de óxido nítrico, ao tratamento habitual de pacientes com diagnóstico de esquizofrenia.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Tiago Moraes Guimarães

CRM-SP: 147.782

Email: tiagopqu@gmail.com

Endereço: Avenida Bandeirantes, 3900. Ribeirão Preto-SP. CEP: 14049-900

Fone: Laboratório de Psicofarmacologia: (16) 3602-2703 / Comitê de Ética em Pesquisa: (16) 3602-2228 / Para horários não comerciais: (16) 98122-9392 (pesquisador responsável)

Você, paciente dos Ambulatórios de Esquizofrenia (APQE) e de Reabilitação Psicossocial (AREP) do Hospital das Clínicas (HCFMRP-USP), está sendo convidado a participar de uma pesquisa científica. Antes que você decida é importante que você entenda o porquê esta pesquisa está sendo feita e o que significa participar dela. É também muito importante que você saiba que o tratamento que você faz e as medicações que você vem tomando não serão mudados em nenhum momento por causa dessa pesquisa. Suas informações pessoais também serão mantidas em sigilo. Caso você não aceite participar dessa pesquisa, seu acompanhamento em nosso serviço continuará sendo o mesmo, sem nenhum prejuízo.

Por favor, leia atentamente as informações a seguir e discuta as mesmas com outras pessoas que você considere importantes e que possam lhe ajudar a decidir, se assim o desejar. Caso você tenha alguma dúvida durante a leitura, não se envergonhe em perguntar para que eu possa esclarecê-lo. Leve o tempo que for necessário para tomar sua decisão se irá participar ou não deste estudo.

1. Justificativa e objetivo da pesquisa:

Estudos prévios em seres humanos, realizados por essa equipe de pesquisa, mostraram que uma medicação chamada nitroprussiato de sódio, utilizada há várias décadas de forma segura para tratar picos de pressão alta, pode melhorar sintomas presentes na Esquizofrenia. O mononitrato, medicação da mesma família do nitroprussiato e utilizada em pacientes com problemas no coração, é mais fácil de ser usada, mais barata e com menos efeitos colaterais que o nitroprussiato, motivo que nos fez utilizá-la neste estudo. Além de melhorar sintomas como ouvir vozes, ver vultos e acreditar em coisas que não estão acontecendo, o nitroprussiato também mostrou melhora importante na interação do paciente com o ambiente, na memória, na atenção e no comportamento. O presente estudo pretende avaliar a ação dessa outra medicação, o mononitrato, através da aplicação de escalas, testes e exames de ressonância magnética.

2. Os procedimentos que serão utilizados e seu propósito, bem como a identificação dos procedimentos que são experimentais:

A pesquisa irá durar oito semanas e contará com a participação de 24 pessoas que tem o diagnóstico de Esquizofrenia. Dentre os 24 voluntários, 16 serão sorteados para realizar os exames de Ressonância Nuclear Magnética Funcional, que ocorrerão em três ocasiões; no início, após quatro semanas e no fim. Você também responderá questionários aplicados pelo pesquisador que visam avaliar seus sintomas. Durante quatro semanas você tomará uma cápsula com o mononitrato e por mais quatro semanas uma cápsula sem efeito, que é chamada de placebo. Nem o pesquisador responsável e nem você saberão o que tem dentro da cápsula até que o estudo tenha terminado. A pesquisa será dividida em duas fases: na primeira fase, 12 pessoas tomarão a cápsula com mononitrato por 28 dias e 12 pessoas tomarão o placebo por 28 dias. Na segunda fase, as pessoas que estavam tomando a cápsula com mononitrato passarão a tomar o placebo e as que estava tomando o placebo, passarão a tomar a cápsula com mononitrato. Os exames de imagem serão realizados no dia que antecede o início da ingestão das cápsulas, no dia em que completar 28 dias e no dia que completar 56 dias. Por três vezes, uma no início, outra na metade e outra no fim do estudo, serão aplicados testes para avaliar funções como memória e atenção. Por oito vezes, uma vez por semana, serão aplicados questionários para avaliar seus sintomas.

O mononitrato e o placebo serão entregues a você pelo pesquisador responsável em duas ocasiões: 28 cápsulas serão entregues durante a realização do primeiro exame de imagem e 28 cápsulas serão entregues durante a realização do segundo exames de imagem, 28 dias após o início do estudo.

Os questionários semanais serão realizados no HC-FMRP-USP, eles tem o objetivo de avaliar os efeitos colaterais da medicação, como dor de cabeça e de avaliar os sintomas da esquizofrenia, como ouvir vozes e se sentir perseguido. Durarão cerca de 15 minutos e parecerão com as consultas que você já está habituado a fazer no HC-FMRP-USP.

O teste para avaliar funções como memória e atenção será realizado no mesmo dia da RNMf e durará cerca de 1h30m. Você poderá descansar o tempo que quiser e até desistir de continuar no estudo. Nesses dias também serão repetidos os testes para avaliar efeitos colaterais e os sintomas da esquizofrenia. A duração total nesse dia será de cerca de 3 horas, o que será cansativo. Serão 3 dias assim durante a pesquisa.

É importante deixar claro que o tempo da pesquisa não irá influenciar no seu tratamento e que se seu médico quiser mudar sua medicação ou houver necessidade de internação, você poderá sair do estudo a qualquer momento. O pesquisador responsável não irá modificar o tratamento que você está fazendo, apenas acrescentará o Mononitrato. Como você já é paciente ou do Ambulatório de Esquizofrenia (APQE) ou do Ambulatório de Reabilitação Psicossocial (AREP), ambos do Hospital das Clínicas (HCFMRP-USP) seu seguimento não será prejudicado e continuará normalmente.

Sobre o exame de imagem do seu cérebro chamado Ressonância Nuclear Magnética Funcional (RNMf) é importante esclarecer que esse exame não precisa injetar qualquer substância no seu sangue e os motivos que impedem uma pessoa de realizá-lo são semelhantes aos da Ressonância Nuclear Magnética comum, como o uso de marcapassos. Esse exame dura cerca de 42min e você também pode pedir para sair da máquina se não estiver se sentindo bem. Todo paciente será submetido

as perguntas padrões do hospital antes da realização do exame para saber se pode fazê-lo sem riscos à saúde. As avaliações serão feitas nos mesmos consultórios que você já está acostumado a ser atendido e os exames serão realizados também nos mesmo lugares onde você já fez exames no HCFMRP-USP.

Os voluntários receberão 25 reais para custos de transporte e alimentação nos três dias em que as avaliações serão mais demoradas.

3. Desconfortos e riscos esperados:

A substância (mononitrato) que você receberá já foi estudada em outras pessoas e não proporcionou efeitos desagradáveis graves ou risco à vida. De qualquer forma, o pesquisador responsável estará atento à qualquer desconforto que você venha a sentir. Caso você se sinta mal durante os exames ou durante o tratamento poderá conversar sobre isso e, caso você continue a se sentir incomodado, os exames, testes ou a cápsula poderão ser suspensos a qualquer momento. O principal efeito adverso do Mononitrato é a cefaleia (dor de cabeça), se isso acontecer você poderá tomar Paracetamol, 500mg, até 4x ao dia, a receita será entregue a você assim que o estudo iniciar. Se a dor persistir e for muito forte, entre em contato com o pesquisador a qualquer momento para receber as orientações de como proceder em cada caso, se necessário, você será atendido pelo pesquisador responsável, que é médico, ou orientado sobre a conduta mais adequada. Caso os sintomas da esquizofrenia piorem, serão tomadas as medidas comuns do seu ambulatório, como antecipação das consultas e ajuste das medicações. Você terá a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar no estudo sem que isso lhe traga qualquer prejuízo. Caso você se interesse, os resultados dos seus exames e da pesquisa serão fornecidos, assim que disponíveis.

Na RNMf, você deverá permanecer deitado sem se movimentar por cerca de 42 minutos, para podermos avaliar o funcionamento de seu cérebro, algumas pessoas podem se sentir desconfortáveis dentro do aparelho, que é muito "fechado". Se você se sentir mal durante o exame, basta apertar o botão de um controle que será dado a você. O exame poderá ser cancelado imediatamente.

Como já foi dito, as avaliações semanais serão rápidas e pouco cansativas. Os dias de realização do exame serão mais demorados devido ao cansaço do teste para avaliar memória e atenção, que durará cerca de 1h30m e serão feitos por 3 vezes com trinta dias de intervalo entre cada teste.

Enquanto estiver no estudo você não poderá fazer uso de medicações para disfunção erétil e impotência sexual, como Tadalafil (Cialis), Sildenafil (Viagra) e Vardenafil (Levitra).

Você tem direito a indenização, conforme as leis vigentes no país, caso ocorra prejuízos decorrentes de participação na pesquisa.

4. Benefícios que se pode obter:

O esclarecimento de como a mononitrato age no cérebro, e se é capaz de reduzir sintomas em pessoas com diagnóstico semelhante ao seu (Esquizofrenia), poderão aumentar o nosso entendimento dos seus potenciais efeitos benéficos e fornecer uma base científica para novos usos da medicação na medicina. Além disso, você poderá se sentir melhor com a medicação devido à redução dos sintomas como ouvir vozes, se sentir perseguido ou ter dificuldades de memória.

PESQUISADOR:

Eu _____,
R.G. _____, abaixo assinado, tendo recebido as informações acima e ciente dos meus direitos abaixo relacionados, concordo em participar com:

1. A garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou o esclarecimento a qualquer dúvida acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros relacionados com a pesquisa e o tratamento a que serei submetido;
2. A liberdade de retirar meu consentimento a qualquer momento e deixar de participar no estudo sem que isso traga prejuízo à continuidade do meu cuidado e tratamento;
3. A segurança de que não serei identificado e que será mantido o caráter confidencial da informação relacionada com a minha privacidade;
4. O compromisso de me proporcionar informação atualizada durante o estudo, ainda que esta possa afetar minha vontade de continuar participando;
5. A garantia de acesso aos resultados;
6. A garantia de receber uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, assinado e rubricado em todas as páginas por mim e pelo pesquisador;
7. A disponibilidade de tratamento médico e a indenização que legalmente teria direito, em caso de danos que a justifiquem, diretamente causados pela pesquisa e;
8. Que se existirem gastos adicionais estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.

Tenho ciência do exposto acima e desejo utilizar o produto como método terapêutico recomendado pelo médico que subscreve este documento.

Ribeirão Preto, _____ de _____ de _____

X _____
ASSINATURA DO PACIENTE (OU RESPONSÁVEL LEGAL)

X _____
(ASSINATURA DO PESQUISADOR RESPONSÁVEL)

ANEXO A

Escala das Síndromes Positiva e Negativa – PANSS

Escala Positiva

- P1 - Delírios 1..... 2..... 3..... 4..... 5..... 6..... 7
- P2 - Desorganização conceitual 1..... 2..... 3..... 4..... 5..... 6..... 7
- P3 - Comportamento alucinatório 1..... 2..... 3..... 4..... 5..... 6..... 7
- P4 - Excitação 1..... 2..... 3..... 4..... 5..... 6..... 7
- P5 - Grandeza 1..... 2..... 3..... 4..... 5..... 6..... 7
- P6 - Desconfiança 1..... 2..... 3..... 4..... 5..... 6..... 7
- P7 - Hostilidade 1..... 2..... 3..... 4..... 5..... 6..... 7

Escala Negativa

- N1 - Afetividade embotada 1..... 2..... 3..... 4..... 5..... 6..... 7
- N2 - Retraimento emocional 1..... 2..... 3..... 4..... 5..... 6..... 7
- N3 - Contato pobre 1..... 2..... 3..... 4..... 5..... 6..... 7
- N4 - Retraimento social passivo/apático 1..... 2..... 3..... 4..... 5..... 6..... 7
- N5 - Dificuldade pensamento abstrato 1..... 2..... 3..... 4..... 5..... 6..... 7
- N6 - Falta de espontaneidade e fluência 1..... 2..... 3..... 4..... 5..... 6..... 7
- N7 - Pensamento estereotipado 1..... 2..... 3..... 4..... 5..... 6..... 7

Escala de Psicopatologia Geral

- G1 - Preocupação somática 1..... 2..... 3..... 4..... 5..... 6..... 7
- G2 - Ansiedade 1..... 2..... 3..... 4..... 5..... 6..... 7
- G3 - Culpa 1..... 2..... 3..... 4..... 5..... 6..... 7
- G4 - Tensão 1..... 2..... 3..... 4..... 5..... 6..... 7
- G5 - Maneirismo/postura 1..... 2..... 3..... 4..... 5..... 6..... 7
- G6 - Depressão 1..... 2..... 3..... 4..... 5..... 6..... 7
- G7 - Retardo motor 1..... 2..... 3..... 4..... 5..... 6..... 7

- G8 - Falta de cooperação...1..... 2..... 3..... 4..... 5..... 6.....7
- G9 - Conteúdo incomum pensamento1..... 2..... 3..... 4..... 5..... 6.....7
- G10 - Desorientação1..... 2..... 3..... 4..... 5..... 6.....7
- G11 - Déficit atenção1..... 2..... 3..... 4..... 5..... 6.....7
- G12 - Juízo e crítica.....1..... 2..... 3..... 4..... 5..... 6..... 7
- G13 - Distúrbio volição1..... 2..... 3..... 4..... 5.....6.....7
- G14 - Mau controle impulso1..... 2..... 3..... 4..... 5..... 6.....7
- G15 - Preocupação1..... 2..... 3..... 4..... 5..... 6..... 7
- G16 - Esquiva social ativa ...1..... 2..... 3..... 4..... 5..... 6.....7

Tipo sintomatológico:

Positivo (3 ou mais sintomas com o escore > ou = 4 na escala positiva e menos de 3 sintomas com escore > ou = 4 na escala negativa);

Negativo (3 ou mais sintomas com o escore > ou = 4 na escala negativa e menos de 3 sintomas com escore > ou = 4 na escala positiva);

Misto (3 ou mais sintomas com escore > ou = em ambas as escalas);

Nenhum tipo (quando não se aplicam os critérios anteriores)

ANEXO B

Página inicial da Bateria Cognitiva Consensual MATRICS.

<h1 style="margin: 0;">Formulário A do aplicador</h1>	 Bateria cognitiva consensual MATRICS
---	---

Aplicador _____

Avaliação nº. _____

DADOS DO RESPONDENTE
Número de identificação: _____
Nome (opcional): _____
Data do teste: _____ / _____ / _____ Ano Mês Dia
Data de nascimento: _____ / _____ / _____ Ano Mês Dia
Idade: = _____ Ano Meses
Sexo: ☐ Feminino ☐ Masculino
Raça:
☐ Branco
☐ Afrodescendente ou negro
☐ Hispânico ou latino
☐ Asiático
☐ Índio norte-americano/nativo do Alasca
☐ Ilhéu do Pacífico
☐ Mais de uma raça (especificar) _____
Etnia:
☐ Hispânica ou latina
☐ Não hispânica/latina
Lateralidade (escrita a mão):
☐ Destro ☐ Canhoto
Maior grau de escolaridade (anos em tempo integral):
_____ Respondente
_____ Pai do respondente
_____ Mãe do respondente
Outras informações:

MATRICS
Assessment Inc.

TABELA DE PONTUAÇÃO					
Teste	Pontuação bruta				T-score*
					Percentil*
1 TMT					
2 BACS SC					
3 HVLT-R	P-1	P-2	P-3	Soma	
4 WMS-III SS					
5 LNS					
6 NAB Mazes					
7 BVMT-R	P-1	P-2	P-3	Soma	
8 Fluency					
9 MSCEIT™ ME					
10 CPT-IP	2-D	3-D	4-D	Média	

TABELA DE PONTUAÇÃO DE DOMÍNIO COGNITIVO		
Domínio	T-score*	Percentil*
Velocidade de processamento (composto de T-scores/percentis de (1) TMT, (2) BACS SC e (3) Fluency)		
Atenção/Vigilância (pontuações para CPT-IP)		
Memória de trabalho (composta de T-scores /percentis para (1) WMS-III SS e (2) LNS)		
Aprendizado verbal (pontuações para HVLT-R)		
Aprendizado visual (pontuações para BVMT-R)		
Raciocínio e resolução de problemas (pontuações para NAB Mazes)		
Cognição social (pontuações para MSCEIT™ ME)		
PONTUAÇÃO COMPOSTA GERAL		

*No Apêndice C do manual da MCCB em inglês consulte as tabelas que convertem as pontuações brutas em T-scores e percentis. O verso deste formulário apresenta orientações para o preenchimento da primeira página.

Efeitos Colaterais	Sintomas	Não Aval.					Relação Causal		
		9	0	1	2	3	imp	pos	prb
1.1	Dificuldade de concentração								
1.2	Astenia/lassidão/cansaço								
1.3	Sonolência/sedação								
1.4	Dificuldade de memória								
1.5	Depressão								
1.6	Tensão/inquietação								
1.7	Aumento da duração do sono								
1.8	Diminuição da duração do sono								
1.9	Aumento da atividade onírica								
1.10	Indiferença emocional								
2.1	Distonia								
2.2	Rigidez								
2.3	Hipocinesia/ acinesia								
2.4	Hipercinesia								
2.5	Tremor								
2.6	Acatisia								
2.7	Convulsões epilépticas								
2.8	Parestesias								
3.1	Alteração da acomodação visual								
3.2	Aumento da salivação								
3.3	Diminuição da salivação								
3.4	Náuseas/ vômitos								
3.5	Diarréia								
3.6	Constipação								
3.7	Distúrbios da micção								
3.8	Poliúria/ polidipsia								
3.9	Tontura ortostática								
3.10	Palpitações/ taquicardia								
3.11	Aumento da tendência para suar								
4.1	Eritema								
4.1.a	Eritema morbiliforme								
4.1.b	Eritema petequial								
4.1.c	Eritema urticariforme								
4.1.d	Eritema psoriático								
4.1.e	Eritema não classificado								
4.2	Prurido								
4.3	Fotossensibilidade								
4.4	Aumento de pigmentação								
4.5	Ganho de peso								
4.6	Perda de peso								
4.7	Menorragia								

4.8	Amenorréia								
4.9	Galactorréia								
4.10	Ginecomastia								
4.11	Aumento da desejo sexual								
4.12	Diminuição da desejo sexual								
4.13	Disfunção erétil								
4.14	Disfunção ejaculatória								
4.15	Disfunção orgástica								
4.16	Secura vaginal								
4.17	Cefaleia								
4.17.a	Tipo tensão								
4.17.b	Enxaqueca								
4.17.c	Outras formas								
4.18	Dependência física								
4.19	Dependência psíquica								

Avaliação global da interferência dos efeitos colaterais nas atividades diárias do paciente

	Avaliado pelo	
	Paciente	Médico
0 Sem efeitos colaterais		
1 Efeitos colaterais leves que não interferem na atividade do paciente		
2 Efeitos colaterais que moderadamente interferem na atividade do paciente		
3 Efeitos colaterais que marcadamente interferem na atividade do paciente		

Consequência

0 Nenhuma ação

1 Avaliação mais frequente do paciente, mas sem redução de dose, e/ou tratamento medicamentoso ocasional do efeito colateral

2 Redução da dose e/ou tratamento medicamentoso contínuo dos efeitos colaterais

3 Descontinuação do fármaco ou mudança para outro fármaco

ANEXO D**PARECER CONSUBSTANCIADO — CEP****Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Foram reapresentados o TCLE Versão 2.0 de 11/07/2014 e projeto de pesquisa de Versão 2.0 de 11/07/2014.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto e à luz da Resolução CNS 466/2012, o projeto de pesquisa versão 2.0 de

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO **Bairro:** MONTE ALEGRE

UF: SP **Município:** **Telefone:** (16) 3602-2228

CEP: 14.048-900 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br

RIBEIRAO PRETO

Página 06 de 07

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA USP -

Continuação do Parecer: 773.290

11/07/2014, assim como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido versão 2.0 de 11/07/2014, podem ser enquadrados na categoria APROVADO.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto Aprovado: Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP, relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP em nova versão, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

RIBEIRAO PRETO, 01 de Setembro de 2014

Assinado por:

MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA (Coordenador)

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO **Bairro:** MONTE ALEGRE

UF: SP **Município:** **Telefone:** (16)3602-2228

CEP: 14.048-900 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br

RIBEIRAO PRETO

Mononitrate Isosorbide as an adjunctive therapy in schizophrenia: A randomized controlled crossover trial

Tiago M Guimarães^{1,2}, Mara R C Guimarães, Ícaro A F Oliveira³; Renata F Leoni³, Antonio C Santos⁵, Serdar M Dursun^{2,4}, Glen Baker^{2,4}, Jaime E C Hallak^{1,2,4},

¹Neuroscience and Behavioral Sciences Department, Ribeirao Preto Medical School, University of São Paulo, Brazil

²National Institute for Science and Technology Translational Medicine (INCT TM), CNPq/FAPESP/CAPES, Brazil

³Departamento de Física, FFCLRP, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil

⁴Department of Psychiatry, University of Alberta, Canada

⁵Department of Internal Medicine, Radiology Division, Ribeirao Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil

Corresponding author:

Prof. Dr. Tiago

Departamento de Neurociências e Ciências do Comportamento – FMRP – Universidade de São Paulo

Av. Bandeirantes, 3900 - 14.040-901 – Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil

Phone: +55 16 3602 2703

Email: t.guimaraes@icloud .com

Abstract

Background: Schizophrenia is a disabling complex mental disorder and many patients remain partial- or non-responders to all available treatment. Accumulating evidence for the role of the glutamate/nitric oxide pathway in mediating positive and negative symptoms in schizophrenia suggests a potential benefit for drugs that modulate it. The aim of this study was to test the efficacy of mononitrate isosorbide (MNT), as adjunctive therapy, in symptomatic outpatients with schizophrenia.

Methods: Two-month randomized, double blind, placebo-controlled crossover trial. 24 patients initiated with either mononitrate 50mg once daily or placebo through four weeks and then crossed to another four weeks. We used Positive and Negative Syndrome Scale (PANSS), Clinical Global Impression (CGI), Global Assessment of Functioning (GAF), Matrics Cognitive Consensual Battery (MCCB) for symptoms assessment and functional neuroimaging, arterial spin labeling (ASL), for brain activation patterns. **Results:** PANNS total, general, and positive, GAF, and CGI scores showed significant differences in treatment effects between the experimental group and controls. No treatment effects were shown in MCCB and negative PANSS. A posthoc neuroimaging analysis showed reduction in thalamic activity in a more severe subgroup of patients.

Conclusions: With the exception of the MCCB and of the PANSS negative subscale, antipsychotic-treated patients with schizophrenia with evidence of treatment resistance showed statistically significant improvement in symptoms after four weeks of MNT 50mg/day across all of the measured outcomes.

MNT added significant beneficial effects to antipsychotic treatment in terms of positive symptoms and of functioning.

Keywords: isosorbide mononitrate, schizophrenia, MATRICS, MCCB, ASL, functional neuroimaging.

Introduction

Schizophrenia is a chronic and disabling condition arising early in adult life, characterized by social impairment, low motivation, blunted motivational affect (negative symptoms), delusions, hallucinations, disorganized speech and behavior (positive and disorganized symptoms), and cognitive symptoms (PERALTA; CUESTA, 2001). In the general population, prevalence has been estimated at 0.7%, with a substantial economic burden caused by the disorder (CLOUTIER et al., 2016). Antipsychotics, drugs that act in the dopaminergic system, are associated with significant levels of partial- or non-response to multiple trials, clozapine included (LEUCHT et al., 2009).

Accumulating evidence for the role of the glutamate pathway in mediating positive and negatives symptoms in schizophrenia, suggests a potential benefit for drugs that can modulate it (KANTROWITZ; JAVITT, 2010) (DALMAU et al., 2008). Still, the efficacy of compounds that boosts n-methyl-d-aspartate receptors (NMDAR) — which are glutamate receptors — neurotransmission has been variable across studies (BUCHANAN et al., 2007) (TSAI; LIN, 2010).

Glutamate activation of NMDAR releases intracellular nitric oxide (NO) through activation of neuronal NO synthase (BREDT; SNYDER, 1992). Would drugs that release NO bypass the NMDAR and exert their effects directly into the neuron?

In 2013, Hallak and colleagues showed that a single 4h-infusion of sodium nitroprusside (SNP), a nitrate vasodilator that releases NO, was able to decrease psychotics symptoms in patients with schizophrenia, as measured by the Brief Psychiatric Rating Scale (HALLAK et al., 2013). The same group conducted a follow-

up trial with SNP and demonstrated improvements in the cognitive function of such patients (MAIA-DE-OLIVEIRA et al., 2015b).

SNP is not the only nitrate vasodilator and has its peculiarities: intravenous administration, slow infusion, and continuous monitorization. Mononitrate isosorbide (MNT) is also a nitrate vasodilator, and has an oral, once daily, extended release formulation; therefore it would be a more suitable drug if NO donors were found to be efficacious compounds in the treatment of patients with schizophrenia (OMAR; ARTIME; WEBB, 2012).

Brain perfusion has been continuously investigated in schizophrenia, and cerebral blood flow (CBF) alterations during resting state have been reported in patients compared to healthy controls (ANDREASEN et al., 1997). Arterial spin labeling (ASL), a non-invasive magnetic resonance imaging (MRI) technique, is an important tool for obtaining CBF maps. (ALSOP et al., 2015).

We hence conducted a 2-month randomized controlled trial with a crossover design to investigate the efficacy of MNT in reducing negative, positive, and cognitive symptoms in patients with schizophrenia. We also assessed brain perfusion in such patients using ASL-MRI.

Methods

Participants

We recruited patients from community mental health facilities in Ribeirao Preto, Brazil, and surrounding towns, with a catchment population of approximately 1,500,000 people. All of them were in 'treatment as usual' in the schizophrenia service of the reference regional hospital, Clinical Hospital of Ribeirao Preto Medical School, University of São Paulo (HCFMRP-USP).

Subjects with a DSM-IV diagnosis of schizophrenia for at least one year, confirmed by the Structured Clinical Interview (SCID) for DSM-IV, were enrolled. Main inclusion criteria were: age range 18–50 years and at least one item ≥ 4 on the positive or negative subscales of the Positive and Negative Symptoms Scale (PANSS). The main exclusion criteria were: a diagnosis of intellectual disability or of a neurological disease such as epilepsy or previous ischemic stroke, being pregnant or breastfeeding (or having given birth in the past 6 months/breastfeeding in the past 3 months) and a history of alcohol or substance dependence in the last year (except nicotine).

This study was conducted in accordance with the declaration of Helsinki, approved by the ethical board of the Neuroscience and Behavioral Sciences Department, Ribeirao Preto Medical School, University of São Paulo (HCFMRP-USP), and registered in the Brazilian Register of Clinical Trials (<http://www.ensaiosclinicos.gov.br>) under the number RBR-8kyq7g. Written informed consent was obtained from all subjects. If new interventions, including psychotherapy, were necessary during trial time, the researcher would stop the trial. All patients included in the clinical trial maintained usual office visits and underwent full clinical evaluation.

Study Design and study drug

The experiment was an add-on, double blind, placebo-controlled, crossover trial (Figure 1). Subjects self-administered one month of daily oral isosorbide mononitrate extended release (Monocordil, Baldacci®) and one month of daily oral placebo. The study ratio was 1:1. MNT was dosed at 50mg once a day and a caregiver was asked to monitor and record all administrations. This dose was selected based on the usual initial dose used in patients with *angina pectoris* (NORDLANDER; WALTER, 1994).

The treatment order (MNT/placebo or placebo/MNT) was randomly assigned using a computer generated random sequence. Order of assumption of MNT/placebo was obtained by blocked randomization (block size = 4) and patient stratification according to gender (male, female). Group 1 (G1) started with placebo and group 2 (G2) with MNT.

The participant rater and study staff enrolling patients were all blinded to treatment conditions.

Assessments

The PANSS was used as the primary outcome measure and was administered at baseline (T0) and weekly until the trial last day (T2)(KAY; FISZBEIN; OPLER, 1987). This scale can be used to assess changes in severity of psychopathologic conditions. However, the clinical implications of PANSS scores are not readily clear. As a solution to this problem, one can use the PANSS with scales that clinicians understand intuitively, like the CGI, another scale we used to assess efficacy (GUY, 1976).

The patients' level of functioning was assessed weekly using the Global Assessment of Functioning (GAF) scale(JONES et al., 1995). There are some studies that point to a correlation between GAF, CGI and PANSS and that is feasible to use such instrument to evaluate global functioning (SUZUKI et al., 2015).

We assessed cognitive function with the MATRICS Consensual Cognitive Battery (MCCB), Brazilian Version (FONSECA et al., 2017). This instrument was developed to standardize cognitive measures for schizophrenia, and consists of ten tests that assess seven cognitive domains (KERN et al., 2008).

Safety assessment

The structured *Ugvalg for Kliniske Undersgeiser* (UKU) rating scale was used weekly to prospectively assess the treatment adverse effects during this study (LINGJAERDE et al., 1987). A comprehensive physical examination, clinical laboratory tests (glucose, BUN, creatinine, bicarbonate, Cl, Na, K) and vital signs were performed. Female participants underwent a pregnancy test at baseline.

Magnetic Resonance Imaging

MRI data were acquired on a 3 T system (Philips Achieva, The Netherlands) using a 32-channel head coil for reception and a body coil for transmission. Pseudocontinuous ASL (pCASL) images were obtained using a 2D single-shot EPI sequence with the following parameters: TR/TE = 4000/14 ms, FA = 90°, matrix = 160 × 160, FOV = 240 × 240 mm², 20 5-mm slices (no gap), labeling duration = 1650 ms, post-labeling delay = 1525 ms, 50 control/label pairs, total scan duration = 6 min and 48 s. Structural images were acquired using a 3D gradient-echo T1-weighted sequence (TR/TE = 7/3.2ms, FA = 8°, matrix = 240 × 240, FOV = 240 × 240mm², 160 slices with 1 millimeter isotropic resolution). All patients were instructed to stay awake, think of nothing in particular and move as little as possible during the scan. For CBF quantification, a proton density (M0) image was acquired separately with the same geometry and parameters of the pCASL sequence, but without labeling pulses.

Image processing

An ASL toolkit (ASLtbx (WANG et al., 2008)) available for SPM12 was used to perform image processing steps, consisting of: motion correction, coregistration to anatomical image, temporal filtering, spatial smoothing with an isotropic Gaussian kernel (FWHM = 4 mm), CBF quantification, and normalization to MNI standard space (resolution: 2

$\times 2 \times 2 \text{ mm}^3$, matrix size: $79 \times 95 \times 79$). We also performed additional steps to improve CBF quantification: residual motion correction, removal of CBF outlier images, and a partial volume correction (PVE). CBF quantification details can be accessed in our previous study (OLIVEIRA et al., 2018)

We analyzed 16 regions of interest (ROI) selected from Harvard-Oxford atlas: right and left dorsolateral prefrontal cortex, anterior cingulate, posterior cingulate, right and left hippocampus, thalamus, amygdala, inferior parietal lobe (anterior and posterior portions of the supramarginal gyrus, and angular gyrus).

Statistical Methods

Analyses on patients' outcomes were conducted on an intention-to-treat (ITT) basis. In a simple two-period, two-group crossover study, each mean effect can be reported as $x_{m,n}$, where m (1 or 2) was treatment (1 = placebo or 2 = MNT) and n (1 or 2) was period (1 = from T0 to T1, 2 = from T1 to T2). Treatment, time and carryover effect were assessed according to Grizzle (GRIZZLE, 1965). To test the treatment effect, the sum of results of treatment 1 was compared with treatment 2 results ($x_{1.1}+x_{1.2}$ versus $x_{2.1}+x_{2.2}$). To trace time effect, the sum of results in period 1 was compared with the period results ($x_{1.1} + x_{2.1}$ versus $x_{1.2} + x_{2.2}$). Finally, to trace any possible carryover effect, the sum of the results in group 1 was compared with the group results ($x_{1.1} + x_{2.2}$ versus $x_{1.2} + x_{2.1}$). The null hypotheses were tested using paired t tests for the PANSS total score and its three subscales, the GAF, and the MCCB. For the CGI, an ordinal scale, we used the Friedman test to assess changes thorough time. For the clinical and demographic data, the χ^2 test was used when data were categorical.

Sample size determination was based on the assumption that for the PANSS, a difference of 8 points, corresponding to an effect size of approximately 1.5 SDs

between the placebo and treatment groups, would represent a clinically significant response. Calculations were based on the assumption of a 2-sample *t* test with independent groups and the probability of a type I error set at 0.05. Considering a 2-sided alternative hypothesis and a desired power value of 0.8, calculations indicated that a minimum of 8 individuals were required in each group.

All clinical and demographic data were analyzed using SPSS statistical software, version 17.0 (SPSS Inc.).

For the CBF analysis we used the software R (R Development Core, 2008). Group differences were assessed at the ROI level using two-sample *t*-tests (Welch's *t*-test) and correcting for multiple comparison (FDR correction). We performed two discrete analysis: Group 1 + Group 2 at baseline compared with the last day of the active drug for each group ([G1 + G2] x G1 at T1, [G1 + G2] x G2 at T2), and within group comparison (G1 at T0 x G1 at T1, G1 at T0 x G1 at T2, and G2 at T0 x G2 at T1, G2 at T0 x G2 at T2).

Results

Patient recruitment and all study procedures occurred until December, 2017. Twenty-four individuals were included in the trial, and twenty patients completed the study procedures. All data from randomized participants were included in the final analysis. Sixteen among the twenty-four were randomized to perform the MRI sessions (Figure 2). All patients were treated with one or two antipsychotics. Twenty (83,3%) were on Clozapine, and nine were on Clozapine and some adjuvant. Only three females were enrolled, and one of them withdraw consent in the first week of the trial. Mean illness duration was 14.85 years (± 6.9), mean age was 34.7 years (± 6.47), mean years in school was 11.3 (± 3.42). In table 1 we show groups characteristics in baseline. No significant differences in group characteristics were found, except for PANSS negative

symptoms subscale and MCCB scores.

The comparison between isosorbide mononitrate and placebo revealed a statistically significant effect of the active drug on PANSS total score, PANSS Positive Symptoms subscale, PANSS General Psychopathology subscale, CGI and GAF that was not influenced by group order, but was significant for treatment, time and interaction between treatment and time.

We found a statistically significant improvement in favor of the active drug in the PANSS total score that was evident from the third week and persisted through the fourth ($F_{8, 144} = 7.31$; $p < 0.001$, treatment effect) (Figure 3).

For the PANSS positive symptoms subscale, statistically significant difference was evident from the third week and persisted through the fourth week ($F_{8, 144} = 5.24$; $p < 0.001$, treatment effect) (Figure 4).

For the PANSS negative subscale, the comparison between isosorbide mononitrate and placebo revealed a statistically significant effect that was influenced by group order, and hence we couldn't perform any further statistical analysis ($F_{8, 144} = 6.92$; $p < 0.001$, order effect)

We found similar results in the PANSS general psychopathology symptoms ($F_{8, 144} = 9.01$; $p < 0.001$, treatment effect. Week 3: $t = 3.05$; $df = 20$; $p < 0.006$. Week 4: $t = 2.84$; $df = 19$; $p < 0.01$).

Improvements in the CGI were consistent with our findings in the PANSS; statistically significant results were already evident from the second week and persisted until week four (Qui-square = 44.49; $df = 8$; $p < 0,001$).

The GAF results were a little different; they were statistically significant only in the third week ($F_{8, 136} = 2.71$; $p < 0.008$) and just a trend persisted in the fourth week (Week 3: $t = -2.45$; $df = 20$; $p < 0.024$. Week 4: $t = -1.96$; $df = 19$; $p < 0,06$).

As well as with PANSS negative subscale, MCCB scores differed between groups in baseline, except for attention/vigilance and social cognition domains. We could not find any treatment effects; both placebo and MNT periods showed statistically significant improvement in working memory ($F_{2,36} = 7.46$; $p < 0.002$) and speed of processing ($F_{2,36} = 6.26$; $p < 0.005$), but no differences on the other domains.

Safety

There were no serious adverse events reported during the study. Adverse effects (AE) measured with UKU showed significant differences in the rates of reported headaches (mild to moderate) for the first ($p < 0.046$) and second ($p < 0.04$) weeks of MNT use. No other adverse events were reported or were statistically significant for the other weeks (headache reporting: third week, $p < 0.079$; fourth week, $p < 0.29$).

Cerebral Blood Flow

We found a statistically significant CBF reduction in the right thalamus of group 1 after MNT (compared to G1 + G2 at baseline; $p = 0.04$, uncorrected) and in the right thalamus ($p = 0.04$, uncorrected) and right angular gyrus ($p = 0.04$, uncorrected) in group 2 also compared to G1 + G2 at baseline.

In the within group comparison, G1 CBF was increased in the left hippocampus after placebo ($p = 0.03$, uncorrected), and decreased in the right thalamus ($p = 0.00005$, corrected for multiple comparisons) and in the right amygdala ($p = 0.03$, uncorrected) after MNT. G2 CBF was increased in the left angular gyrus after MNT ($p = 0.03$, uncorrected), and decreased in the right DLPFC ($p = 0.02$, uncorrected) and in the right supramarginal gyrus ($p = 0.01$, uncorrected).

We performed a *post hoc* comparison between group 1 and group 2 in order to find out

the possible reasons that justified the differences in the within group comparison. G1 showed increased CBF in the right thalamus ($p = 0.02$, uncorrected) and in the right amygdala ($p = 0.04$, uncorrected) when compared to G2 at baseline.

Discussion

We found slight improvements in the PANSS Total, PANSS Positive, PANSS Negative, PANSS General, CGI, and GAF. No differences were demonstrated in the MCCB. Additionally, we detected a decrease in thalamic perfusion after MNT use in the group with most prominent negative symptoms. Overall, MNT was well tolerated.

As there are no published trials to date that tested MNT in patients with schizophrenia, comparing it to other NO donors is only speculative since nitrovasodilators form a heterogeneous group of compounds.

In 2013, Hallak et al (HALLAK et al., 2013) published the first placebo-controlled trial of a single SNP intravenous infusion in individuals with schizophrenia. Twenty inpatients with acute symptoms exacerbation received a 4-hour infusion of SNP at 0.5 $\mu\text{g/kg/min}$ with a significant decrease in positive, negative, anxiety, and depressive symptoms as measured by the Brief Psychiatric Rating Scale and by the PANSS Negative subscale. A follow-up placebo-controlled study performed in the same subjects just resulted in an improvement of cognitive function (MAIA-DE-OLIVEIRA et al., 2015b).

In 2016, Stone et al (STONE et al., 2016) reported no improvement in spatial working memory or in any symptoms assessed after SNP administration. They used the same infusion protocol, albeit there were methodological differences that could account for between trials discrepancies. In the Stone et al study participants were less symptomatic outpatients with milder negative symptoms (PANSS Negative subscale score 20.7 vs 30.0), were older (34.0 vs 25.5 years) and had longer illness duration

(14.5 vs 3.0 years). Schizoaffective disorder patients, cannabis users, smokers and a majority of 'black british' individuals were included.

In 2018, Wang et al (WANG et al., 2018a) published an article reporting their randomized trial in 42 acutely exacerbated schizophrenia inpatients receiving two 4-hour infusions of SNP. Subjects were older (30.5 vs 25.5 years), with milder negative symptoms (PANSS Negative subscale score 23.7 vs 30.0) and with longer illness duration (7.52 vs 3.0 years) when compared to the Hallak et al study. No patients were smokers or cannabis users in this case, and all of them were Han Chinese. Diastolic pressure decreased in the SNP group. Of note, the researchers did not restrict antipsychotic use, so patients received any antipsychotic drug according to need.

In 2019, Brown et al (BROWN et al., 2019) published a randomized, multicenter, placebo-controlled, double-blind clinical trial in 52 outpatients to characterize the efficacy and safety of a single-dose of intravenous SNP in treating the positive, negative, and cognitive symptoms of patients with schizophrenia. They did not find improvements in any measures used. Again, included subjects differed from the Hallak et al study in baseline characteristics as they were older (47.1 vs 25.5 years), which presumes a longer illness course, and with milder negative symptoms (PANSS Negative subscale score 20.9 vs 30.0). Illness duration was not stated. Blood pressure decreased in the SNP group.

Patients in our current study were similar to the previous three randomized trials above mentioned when considering patients age, illness duration and PANSS negative score, characteristics that could explain the differences between the first Hallak et al study and the other three. A singular feature in our study is the high proportion of patients using clozapine (83,3%).

In that case, we can assume that adjunctive daily extended release MNT has a slightly

positive effect in psychiatric symptoms of treatment refractory patients. These patients had persisted with at least one clinically relevant symptom even after clozapine and improved after one month of mononitrate use.

Nitric Oxide donors could be theoretically useful drugs, since endogenous NO has a wide range of physiological processes, including neurotransmission. Soluble guanylyl cyclase is NO most known target and its activation leads to a second messenger cascade based on the cyclic guanosine monophosphate. Alternatively, NO can act directly in other proteins in a process named S-nitrosylation. Through these mechanisms the gas is involved in synaptic activity, neural plasticity and cognition. Low concentrations appears to be neuroprotective and mediate physiological signaling, while higher concentrations appears to be neurotoxic and mediate immune/inflammatory processes.

In addition to testing for the first time MNT in schizophrenia, and to applying standardized scales and a cognitive battery; we were also the first to analyze MNT effects in cerebral blood flow using a quantitative MRI technique called Arterial Spin Labeling. We found that MNT reduced right thalamus blood flow , but this result did not survive correction for multiple comparisons. We performed a within group comparison and found a decrease in right thalamus CBF that survived multiple comparisons in the group with most prominent negative and cognitive symptoms.

Several studies support the finding of increased thalamic activity in schizophrenia patients, especially in those with longer illness duration and longer exposure to antipsychotics (SCHEEF et al., 2010; ZHU et al., 2015)(ANDREASEN et al., 1997). The decrease in thalamus activation after MNT exposure could be a direct effect of the drug.

Limitations

We note important limitations in our study design and interpretation of results.

Sample size and lack of a multicenter approach is a relevant weakness. Headache was the sole adverse effect and may have had an influence in the blinding process, as both the patient and the interviewer were informed that this was the most common reactions to MNT.

Intrinsic to a crossover study is the absence of healthy controls so, for example, the decrease in thalamic activation does not mean this region was hyperactivated, it could be already hypoactivated with further decrease after drug exposure.

Conclusions

Our study was the first to evaluate mononitrate isosorbide in a cohort of patients with schizophrenia and also the first to do this with a standardized cognitive battery while performing a non-invasive CBF measurement with pCASL-MRI.

With the exception of the MCCB and of the PANSS negative subscale, antipsychotic-treated patients with schizophrenia with evidence of treatment resistance showed statistically significant improvement in symptoms after four weeks of MNT 50mg/day across all of the measured outcomes.

References

ABRAMS, J. How to use nitrates. **Cardiovascular drugs and therapy / sponsored by the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy**, v. 16, p. 511–514, 2002.

ABSHAGEN, U. W. Pharmacokinetics of isosorbide mononitrate. **The American journal of cardiology**, v. 70, n. 17, p. 61G-66G, 27 nov. 1992.

ALSOP, D. C. et al. Recommended implementation of arterial spin-labeled perfusion MRI for clinical applications: A consensus of the ISMRM perfusion study group and the European consortium for ASL in dementia. **Magnetic Resonance in Medicine**, v. 73, n. 1, p. 102–116, 1 jan. 2015.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION (ED.). **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders**. fourth ed ed. Washington D.C: [s.n.].

ANDREASEN, N. C. et al. Hypofrontality in schizophrenia: distributed dysfunctional circuits in neuroleptic-naïve patients. **Lancet (London, England)**, v. 349, n. 9067, p. 1730–4, 14 jun. 1997.

ASGHAR, M. S. Effects of glyceryl trinitrate and calcitonin gene-related peptide on BOLD signal and arterial diameter: methodological studies by fMRI and MRA. **Danish medical journal**, v. 59, p. B4489, 2012.

AUGUST, S. M. et al. The MATRICS Consensus Cognitive Battery (MCCB): clinical and cognitive correlates. **Schizophrenia research**, v. 134, n. 1, p. 76–82, jan. 2012.

BELL, D. S. COMPARISON OF AMPHETAMINE PSYCHOSIS AND SCHIZOPHRENIA. **The British journal of psychiatry : the journal of mental science**, v. 111, p. 701–707, 1965.

BENNETT, E. D.; DAVIS, A L. A haemodynamic and pharmacokinetic study to assess a new transdermal nitroglycerin preparation in normal subjects. **European journal of clinical pharmacology**, v. 26, n. 3, p. 293–6, jan. 1984.

BERNSTEIN, H.-G. et al. Nitric oxide and schizophrenia: present knowledge and emerging concepts of therapy. **CNS & neurological disorders drug targets**, v. 10, n. 7, p. 792–807, nov. 2011.

- BERNSTEIN, H.-G.; BOGERTS, B.; KEILHOFF, G. The many faces of nitric oxide in schizophrenia. A review. **Schizophrenia research**, v. 78, p. 69–86, 2005.
- BIRNBAUM, R. et al. Prenatal Expression Patterns of Genes Associated With Neuropsychiatric Disorders. **American Journal of Psychiatry**, v. 171, n. 7, p. 758–767, jul. 2014.
- BLACK, M. D.; MATTHEWS, E. K.; HUMPHREY, P. P. The effects of a photosensitive nitric oxide donor on basal and electrically-stimulated dopamine efflux from the rat striatum in vitro. **Neuropharmacology**, v. 33, p. 1357–1365, 1994.
- BLISS, T. V.; COLLINGRIDGE, G. L. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. **Nature**, v. 361, p. 31–39, 1993.
- BODE-BÖGER, S. M.; KOJDA, G. Organic nitrates in cardiovascular disease. **Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)**, v. 51, p. 307–320, 2005.
- BOROGOVIĆ, A.; ASLLANI, I. Arterial Spin Labeling (ASL) fMRI: advantages, theoretical constraints, and experimental challenges in neurosciences. **International journal of biomedical imaging**, v. 2012, p. 818456, jan. 2012.
- BRAMON, E. et al. Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci. **Nature**, v. 511, n. 7510, p. 421–427, 22 jul. 2014.
- BREIT, D. S.; SNYDER, S. H. Nitric oxide, a novel neuronal messenger. **Neuron**, v. 8, p. 3–11, 1992.
- BRINGAS, M. E. et al. Clozapine administration reverses behavioral, neuronal, and nitric oxide disturbances in the neonatal ventral hippocampus rat. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 4, p. 1848–1857, mar. 2012.
- BROWN, H. E. et al. Efficacy and Tolerability of Adjunctive Intravenous Sodium Nitroprusside Treatment for Outpatients With Schizophrenia. **JAMA Psychiatry**,

2019.

BUCHANAN, R. W. et al. The Cognitive and Negative Symptoms in Schizophrenia Trial (CONSIST): the efficacy of glutamatergic agents for negative symptoms and cognitive impairments. **The American journal of psychiatry**, v. 164, n. 10, p. 1593–602, out. 2007.

BUJAS-BOBANOVIC, M. et al. Blockade of phencyclidine-induced effects by a nitric oxide donor. **Br J Pharmacol**, v. 130, p. 1005–1012, 2000.

BUJAS-BOBANOVIC, M.; ROBERTSON, H. A.; DURSUN, S. M. Effects of nitric oxide synthase inhibitor N(G)-nitro-L-arginine methyl ester on phencyclidine-induced effects in rats. **European journal of pharmacology**, v. 409, n. 1, p. 57–65, 1 dez. 2000.

CHEITLIN, M. D. Should the patient with coronary artery disease use sildenafil? **Preventive cardiology**, v. 6, n. 3, p. 161–5, jan. 2003.

CLOUTIER, M. et al. The economic burden of schizophrenia in the United States in 2013. **The Journal of clinical psychiatry**, 26 abr. 2016.

CORRELL, C. U. et al. Comparison of Early Intervention Services vs Treatment as Usual for Early-Phase Psychosis: A Systematic Review, Meta-analysis, and Meta-regression. **JAMA psychiatry**, v. 75, n. 6, p. 555–565, 2018.

DALMAU, J. et al. Anti-NMDA-receptor encephalitis: case series and analysis of the effects of antibodies. **Lancet neurology**, v. 7, p. 1091–1098, 2008.

DALMAU, J. et al. Clinical experience and laboratory investigations in patients with anti-NMDAR encephalitis. **Lancet neurology**, v. 10, n. 1, p. 63–74, jan. 2011.

DAVIDSON, L. L.; HEINRICHS, R. W. Quantification of frontal and temporal lobe brain-imaging findings in schizophrenia: a meta-analysis. **Psychiatry research**, v. 122, n. 2, p. 69–87, 15 fev. 2003.

DEAKIN, J. F.; SIMPSON, M. D. A two-process theory of schizophrenia: evidence from studies in post-mortem brain. **Journal of psychiatric research**, v. 31, n. 2, p. 277–95, 1997.

DEL-BEN, C. M. et al. Test-retest reliability of the Structured Clinical Interview for DSM-IV - Clinical Version (SCID-CV) translated into portuguese. **Revista brasileira de psiquiatria**, v. 23, p. 156–9, 2001.

FERNÁNDEZ-TOMÉ, P. et al. Neuroprotective effects of DETA-NONOate, a nitric oxide donor, on hydrogen peroxide-induced neurotoxicity in cortical neurones. **Neuropharmacology**, v. 38, p. 1307–1315, 1999.

FONSECA, A. O. et al. The Brazilian standardization of the MATRICS consensus cognitive battery (MCCB): Psychometric study. **Schizophrenia Research**, v. 185, p. 148–153, jul. 2017.

FOUSSIAS, G.; REMINGTON, G. Antipsychotics and schizophrenia: from efficacy and effectiveness to clinical decision-making. **Canadian journal of psychiatry. Revue canadienne de psychiatrie**, v. 55, n. 3, p. 117–25, mar. 2010.

FROMER, M. et al. De novo mutations in schizophrenia implicate synaptic networks. 2014.

FUKUYAMA et al. Clozapine Normalizes a Glutamatergic Transmission Abnormality Induced by an Impaired NMDA Receptor in the Thalamocortical Pathway via the Activation of a Group III Metabotropic Glutamate Receptor. **Biomolecules**, v. 9, n. 6, p. 234, 17 jun. 2019.

GOTTESMAN, I. I. et al. Severe Mental Disorders in Offspring With 2 Psychiatrically Ill Parents. **Archives of General Psychiatry**, v. 67, n. 3, p. 252, 1 mar. 2010.

GRAY, B. E. et al. Detecting reliable cognitive change in individual patients with the MATRICS Consensus Cognitive Battery HHS Public Access. **Schizophr Res**, v. 159,

n. 1, p. 182–187, 2014.

GRIZZLE, J. E. The Two-Period Change-Over Design and Its Use in Clinical Trials.

Biometrics, v. 21, n. 2, p. 467, jun. 1965.

GUIMARÃES, T. M. et al. Arterial spin labeling in patients with schizophrenia: a systematic review. **Archives of Clinical Psychiatry (São Paulo)**, v. 43, n. 6, p. 151–156, dez. 2016.

GUY, W. Clinical global impressions. In: GUY, W. (Ed.). . **ECDEU assessment manual for psychopharmacology (Revised) National Institute of Mental Health**. Rockville, Maryland: [s.n.]. p. 217–221.

HAIG, G. M. et al. A randomized trial to assess the efficacy and safety of ABT-126, a selective $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor agonist, in the treatment of cognitive impairment in schizophrenia. **American Journal of Psychiatry**, v. 173, n. 8, p. 827–835, 2016.

HAIJMA, S. V et al. Brain volumes in schizophrenia: a meta-analysis in over 18 000 subjects. **Schizophrenia bulletin**, v. 39, n. 5, p. 1129–38, set. 2013.

HALLAK, J. E. C. et al. Rapid improvement of acute schizophrenia symptoms after intravenous sodium nitroprusside: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **JAMA psychiatry (Chicago, Ill.)**, v. 70, n. 7, p. 668–76, jul. 2013.

HINDLEY, S. et al. Nitric oxide donors enhance neurotrophin-induced neurite outgrowth through a cGMP-dependent mechanism. **Journal of neuroscience research**, v. 47, p. 427–439, 1997.

HJORTHØJ, C. et al. Years of potential life lost and life expectancy in schizophrenia: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet Psychiatry**, fev. 2017.

HOMAN, P. et al. Repeated measurements of cerebral blood flow in the left superior temporal gyrus reveal tonic hyperactivity in patients with auditory verbal

hallucinations: a possible trait marker. **Frontiers in human neuroscience**, v. 7, n. June, p. 304, jan. 2013.

HOWES, O.; MCCUTCHEON, R.; STONE, J. Glutamate and dopamine in schizophrenia: An update for the 21 st century. **Journal of Psychopharmacology**, v. 29, n. 2, p. 97–115, 13 fev. 2015.

HUAN TAN, B. et al. **Improving the robustness of perfusion imaging with arterial spin labeling magnetic resonance imaging**. [s.l.] Wake Forest University Graduate School of Arts and Sciences, 2010.

JAFFE, A. E. et al. Mapping DNA methylation across development, genotype and schizophrenia in the human frontal cortex. **Nature Neuroscience**, v. 19, n. 1, p. 40–47, 30 jan. 2016.

JOHNSTONE, E. C. et al. Mechanism of the antipsychotic effect in the treatment of acute schizophrenia. **Lancet**, v. 1, p. 848–851, 1978.

JONES, S. H. et al. A brief mental health outcome scale. Reliability and validity of the global assessment of functioning (GAF). **British Journal of Psychiatry**, 1995.

KAHLIG, K. M. et al. Amphetamine induces dopamine efflux through a dopamine transporter channel. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, p. 3495–3500, 2005.

KANDRATAVICIUS, L. et al. Effects of nitric oxide-related compounds in the acute ketamine animal model of schizophrenia. **BMC neuroscience**, v. 16, p. 9, 2015.

KANTROWITZ, J.; JAVITT, D. Thinking Glutamatergically: Changing Concepts of Schizophrenia Based Upon Changing Neurochemical Models. **Clinical Schizophrenia & Related Psychoses**, v. 4, n. 3, p. 189–200, out. 2010.

KAY, S. R.; FISZBEIN, A.; OPLER, L. A. The positive and negative syndrome scale (PANSS) for schizophrenia. **Schizophrenia Bulletin**, 1987.

KERN, R. S. et al. The MATRICS Consensus Cognitive Battery, part 2: co-norming and standardization. **The American journal of psychiatry**, v. 165, n. 2, p. 214–20, fev. 2008.

KIRKPATRICK, B. et al. **The NIMH-MATRICES consensus statement on negative symptoms**. Schizophrenia Bulletin. **Anais...**2006

KOOYMAN, I. et al. **Outcomes of public concern in schizophrenia****British Journal of Psychiatry**, 2007.

KOSOGLOU, T. et al. Pharmacokinetics of isosorbide-5-mononitrate after oral administration of an extended-release mononitrate formulation versus a standard dinitrate formulation. **Clinical therapeutics**, v. 17, n. 2, p. 241–51, 1995.

KRAMER, J. C.; FISCHMAN, V. S.; LITTLEFIELD, D. C. Amphetamine abuse. Pattern and effects of high doses taken intravenously. **JAMA : the journal of the American Medical Association**, v. 201, p. 305–309, 1967.

LESLIE, R. A.; JAMES, M. F. Pharmacological magnetic resonance imaging: a new application for functional MRI. **Trends in pharmacological sciences**, v. 21, p. 314–318, 2000.

LEUCHT, S. et al. How effective are second-generation antipsychotic drugs? A meta-analysis of placebo-controlled trials. **Molecular Psychiatry**, v. 14, n. 4, p. 429–447, 8 abr. 2009.

LEUCHT, S. Measurements of Response, Remission, and Recovery in Schizophrenia and Examples for Their Clinical Application. **The Journal of Clinical Psychiatry**, v. 75, n. suppl 1, p. 8–14, fev. 2014.

LEWIS, D. A.; LEVITT, P. Schizophrenia as a disorder of neurodevelopment. **Annual review of neuroscience**, v. 25, p. 409–32, jan. 2002.

LI, T. et al. Brain-Wide Analysis of Functional Connectivity in First-Episode and

Chronic Stages of Schizophrenia. **Schizophrenia Bulletin**, v. 43, n. 2, p. sbw099, 21 jul. 2016.

LIANG, N. Y.; RUTLEDGE, C. O. Evidence for carrier-mediated efflux of dopamine from corpus striatum. **Biochemical pharmacology**, v. 31, n. 15, p. 2479–84, 1 ago. 1982.

LICHTENSTEIN, P. et al. Common genetic determinants of schizophrenia and bipolar disorder in Swedish families: a population-based study. **Lancet (London, England)**, v. 373, n. 9659, p. 234–9, 17 jan. 2009.

LINDSLEY, C. W. et al. Progress towards validating the NMDA receptor hypofunction hypothesis of schizophrenia. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 6, p. 771–785, 2006.

LINGJAERDE, O. et al. The UKU side effect rating scale. A new comprehensive rating scale for psychotropic drugs and a cross-sectional study of side effects in neuroleptic-treated patients. **Acta psychiatrica Scandinavica. Supplementum**, v. 334, p. 1–100, jan. 1987.

LIPSKA, B. K.; JASKIW, G. E.; WEINBERGER, D. R. Postpubertal emergence of hyperresponsiveness to stress and to amphetamine after neonatal excitotoxic hippocampal damage: a potential animal model of schizophrenia.

Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology, v. 9, p. 67–75, 1993.

LONART, G.; WANG, J.; JOHNSON, K. M. Nitric oxide induces neurotransmitter release from hippocampal slices. **European journal of pharmacology**, v. 220, p. 271–272, 1992.

LUBY, E. D. et al. Study of a new schizophrenomimetic drug; sernyl. **A. M. A. archives of neurology and psychiatry**, v. 81, p. 363–369, 1959.

MACDONALD, M. L. et al. Selective Loss of Smaller Spines in Schizophrenia.

American Journal of Psychiatry, v. 174, n. 6, p. 586–594, 1 jun. 2017.

MAIA-DE-OLIVEIRA, J. P. et al. The Effects of Sodium Nitroprusside Treatment on Cognitive Deficits in Schizophrenia. **Journal of Clinical Psychopharmacology**, v. 35, n. 1, p. 83–85, fev. 2015a.

MAIA-DE-OLIVEIRA, J. P. et al. The Effects of Sodium Nitroprusside Treatment on Cognitive Deficits in Schizophrenia. **Journal of Clinical Psychopharmacology**, v. 35, n. 1, p. 83–85, fev. 2015b.

MARSHALL, C. R. et al. Contribution of copy number variants to schizophrenia from a genome-wide study of 41,321 subjects. **Nature genetics**, v. 49, n. 1, p. 27–35, 2017.

MAYER, B.; BERETTA, M. The enigma of nitroglycerin bioactivation and nitrate tolerance: news, views and troubles. **British journal of pharmacology**, v. 155, n. 2, p. 170–84, set. 2008.

MCGRATH, J. et al. Schizophrenia: a concise overview of incidence, prevalence, and mortality. **Epidemiologic reviews**, v. 30, p. 67–76, jan. 2008.

MELTZER, H. Y.; STAHL, S. M. The dopamine hypothesis of schizophrenia: a review. **Schizophrenia bulletin**, v. 2, n. 1, p. 19–76, jan. 1976.

MILLER, M. R.; WADSWORTH, R. M. Understanding organic nitrates--a vein hope? **British journal of pharmacology**, v. 157, p. 565–567, 2009.

MOHER, D. et al. CONSORT 2010 explanation and elaboration: Updated guidelines for reporting parallel group randomised trials q,qq. **International Journal of Surgery**, v. 10, p. 28–55, 2012.

MOORE, H.; WEST, A. R.; GRACE, A. A. The regulation of forebrain dopamine transmission: relevance to the pathophysiology and psychopathology of

schizophrenia. **Biological psychiatry**, v. 46, p. 40–55, 1999.

MORTIMER, A. M. Cognitive function in schizophrenia - Do neuroleptics make a difference? **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 56, n. 4, p. 789–795, 1997.

MUESER, K. T.; MCGURK, S. R. Schizophrenia. **The Lancet**, v. 363, p. 2063–2072, 2004.

MURRAY, R. M. et al. 30 Years on: How the Neurodevelopmental Hypothesis of Schizophrenia Morphed Into the Developmental Risk Factor Model of Psychosis. **Schizophrenia bulletin**, v. 43, n. 6, p. 1190–1196, 21 out. 2017.

NIENDAM, T. A. et al. Meta-analytic evidence for a superordinate cognitive control network subserving diverse executive functions. **Cognitive, Affective, & Behavioral Neuroscience**, v. 12, n. 2, p. 241–268, 27 jun. 2012.

NONG, Y. et al. Glycine binding primes NMDA receptor internalization. **Nature**, v. 422, p. 302–307, 2003.

NORDLANDER, R.; WALTER, M. Once- versus twice-daily administration of controlled-release isosorbide-5-mononitrate 60 mg in the treatment of stable angina pectoris. A randomized, double-blind, cross-over study. The Swedish Multicentre Group. **European heart journal**, v. 15, n. 1, p. 108–13, jan. 1994.

NORRIS, D. G. Principles of magnetic resonance assessment of brain function. **Journal of Magnetic Resonance Imaging**, v. 23, p. 794–807, 2006.

NOSSAMAN, V. E.; NOSSAMAN, B. D.; KADOWITZ, P. J. Nitrates and nitrites in the treatment of ischemic cardiac disease. **Cardiology in review**, v. 18, n. 4, p. 190–7, 2010.

NUECHTERLEIN, K. H. et al. The MATRICS Consensus Cognitive Battery, part 1: test selection, reliability, and validity. **The American journal of psychiatry**, v. 165, n.

February, p. 203–213, 2008.

OGILVIE, P. et al. Induction and variants of neuronal nitric oxide synthase type I during synaptogenesis. **The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 9, p. 799–806, 1995.

OLIVARI, M. T. et al. Hemodynamic and hormonal response to transdermal nitroglycerin in normal subjects and in patients with congestive heart failure. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 2, n. 5, p. 872–8, nov. 1983.

OLIVEIRA, Í. A. F. et al. Brain functional and perfusional alterations in schizophrenia: an arterial spin labeling study. **Psychiatry Research: Neuroimaging**, v. 272, n. 0, p. 71–78, fev. 2018.

OLIVEIRA, J.; ZUARDI, A.; HALLAK, J. Role of Nitric Oxide in Patients with Schizophrenia- a Systematic Review of the Literature. **Current Psychiatry Reviews**, v. 4, n. 4, p. 219–227, 1 nov. 2008.

OMAR, S. A.; ARTIME, E.; WEBB, A. J. A comparison of organic and inorganic nitrates/nitrites. **Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society**, v. 26, n. 4, p. 229–40, 15 maio 2012.

PAGE, N. A.; FUNG, H. Organic Nitrate Metabolism and Action : Toward a Unifying Hypothesis and the Future — A Dedication to Professor Leslie Z . Benet
CONTRIBUTIONS OF THE BENET ' S GROUP TO THE UNDERSTANDING OF ORGANIC NITRATE. v. 102, n. 9, p. 3070–3081, 2013.

PANARIELLO, F. et al. **Age at onset in Canadian Schizophrenia patients: Admixture analysis** **Schizophrenia Research**, 2010.

PERALTA, V.; CUESTA, M. J. How many and which are the psychopathological dimensions in schizophrenia? Issues influencing their ascertainment. **Schizophrenia research**, v. 49, n. 3, p. 269–85, 30 abr. 2001.

- PETERSSON, M. et al. Decreased renal sympathetic activity in response to cardiac unloading with nitroglycerin in patients with heart failure B. v. 7, p. 1003–1010, 2005.
- PIETRZAK, R. H. et al. A comparison of the CogState Schizophrenia Battery and the Measurement and Treatment Research to Improve Cognition in Schizophrenia (MATRICS) Battery in assessing cognitive impairment in chronic schizophrenia. **Journal of Clinical and Experimental Neuropsychology**, v. 31, n. 7, p. 848–859, 18 set. 2009.
- PILOWSKY, L. S.; KERWIN, R. W.; MURRAY, R. M. **Schizophrenia: a neurodevelopmental perspective. Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, 1993.
- PINKHAM, A. et al. Resting quantitative cerebral blood flow in schizophrenia measured by pulsed arterial spin labeling perfusion MRI. **Psychiatry Research - Neuroimaging**, v. 194, n. 1, p. 64–72, 2011.
- PITSIKAS, N.; ZISOPOULOU, S.; SAKELLARIDIS, N. Nitric oxide donor molsidomine attenuates psychotomimetic effects of the NMDA receptor antagonist MK-801. **Journal of neuroscience research**, v. 84, p. 299–305, 2006.
- POLLOCK, J. M. et al. Arterial spin-labeled MR perfusion imaging: clinical applications. **Magnetic resonance imaging clinics of North America**, v. 17, n. 2, p. 315–38, maio 2009.
- PURCELL, S. M. et al. A polygenic burden of rare disruptive mutations in schizophrenia. 2014.
- RAUHALA, P. et al. S-nitrosothiols and nitric oxide, but not sodium nitroprusside, protect nigrostriatal dopamine neurons against iron-induced oxidative stress in vivo. **Synapse (New York, N.Y.)**, v. 23, p. 58–60, 1996.
- RAUHALA, P.; LIN, A. M.; CHIUEH, C. C. Neuroprotection by S-nitrosoglutathione of

brain dopamine neurons from oxidative stress. **The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 12, p. 165–173, 1998.

REYNOLDS, G. P. Increased concentrations and lateral asymmetry of amygdala dopamine in schizophrenia. **Nature**, v. 305, n. 5934, p. 527–9, 1983.

REYNOLDS, G. P. Beyond the dopamine hypothesis. The neurochemical pathology of schizophrenia. **The British journal of psychiatry : the journal of mental science**, v. 155, p. 305–316, 1989.

RÖDER, C. H.; HOOGENDAM, J. M.; VAN DER VEEN, F. M. FMRI, antipsychotics and schizophrenia. Influence of different antipsychotics on BOLD-signal. **Current pharmaceutical design**, v. 16, p. 2012–2025, 2010.

SANTANA, N. et al. Activation of thalamocortical networks by the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist phencyclidine: reversal by clozapine. **Biological psychiatry**, v. 69, n. 10, p. 918–27, 15 maio 2011.

SCHEEF, L. et al. Resting-state perfusion in nonmedicated schizophrenic patients: a continuous arterial spin-labeling 3.0-T MR study. **Radiology**, v. 256, n. 1, p. 253–60, jul. 2010.

SEEMAN, P. et al. Antipsychotic drug doses and neuroleptic/dopamine receptors. **Nature**, v. 261, n. 5562, p. 717–9, 24 jun. 1976.

SIEGEL, R. K. Phencyclidine and ketamine intoxication: a study of four populations of recreational users. **NIDA research monograph**, n. 21, p. 119–47, ago. 1978.

SPEAKMAN, M. T.; KLONER, R. A. Viagra and Cardiovascular Disease. **J.Cardiovasc.Pharmacol.Ther.**, v. 4, p. 259–267, 1999.

STEWART, D. D. Tolerance to nitroglycerin. **JAMA : the journal of the American Medical Association**, v. 44, p. 1678–1679, 1905.

STONE, J. M. et al. The effect of sodium nitroprusside on psychotic symptoms and spatial working memory in patients with schizophrenia: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Psychological Medicine**, v. 46, n. 16, p. 3443–3450, 22 dez. 2016.

SULLIVAN, P. F.; KENDLER, K. S.; NEALE, M. C. Schizophrenia as a Complex Trait. **Archives of General Psychiatry**, v. 60, n. 12, p. 1187, 2003.

SULZER, D.; RAYPORT, S. Amphetamine and other psychostimulants reduce pH gradients in midbrain dopaminergic neurons and chromaffin granules: a mechanism of action. **Neuron**, v. 5, p. 797–808, 1990.

SUZUKI, T. et al. Relationships between global assessment of functioning and other rating scales in clinical trials for schizophrenia. **Psychiatry Research**, v. 227, n. 2–3, p. 265–269, jun. 2015.

TANDON, R. et al. Definition and description of schizophrenia in the DSM-5. **Schizophrenia Research**, v. 150, n. 1, p. 3–10, out. 2013.

TANDON, R.; KESHAVAN, M. S.; NASRALLAH, H. A. Schizophrenia, “just the facts” what we know in 2008. 2. Epidemiology and etiology. **Schizophrenia research**, v. 102, n. 1–3, p. 1–18, jul. 2008.

TANDON, R.; NASRALLAH, H. A; KESHAVAN, M. S. Schizophrenia, “just the facts” 4. Clinical features and conceptualization. **Schizophrenia research**, v. 110, n. 1–3, p. 1–23, maio 2009.

THORNBERG, S. A.; SAKLAD, S. R. A review of NMDA receptors and the phencyclidine model of schizophrenia. **Pharmacotherapy**, v. 16, n. 1, p. 82–93, 1996.

TIENARI, P. et al. **Genetic Boundaries of the Schizophrenia Spectrum: Evidence From the Finnish Adoptive Family Study of Schizophrenia** *Am J Psychiatry*. [s.l.:

s.n.].

TORU, M.; KURUMAJI, A.; ISHIMARU, M. Excitatory amino acids: implications for psychiatric disorders research. **Life sciences**, v. 55, p. 1683–1699, 1994.

TRACEY, I. Prospects for human pharmacological functional magnetic resonance imaging (phMRI). **Journal of clinical pharmacology**, v. Suppl, p. 21S-28S, jul. 2001.

TSAI, G.; LIN, P.-Y. Strategies to Enhance N-Methyl-D-Aspartate Receptor-Mediated Neurotransmission in Schizophrenia, a Critical Review and Meta-Analysis. **Current Pharmaceutical Design**, v. 16, n. 5, p. 522–537, 1 fev. 2010.

TUOMINEN, H. J.; TIIHONEN, J.; WAHLBECK, K. Glutamatergic drugs for schizophrenia: a systematic review and meta-analysis. **Schizophrenia research**, v. 72, p. 225–34, 2005.

URSINI, G. et al. Convergence of placenta biology and genetic risk for schizophrenia. **Nature Medicine**, 2018.

VESSONI, A. L. N. **Adaptação e estudo da confiabilidade da escala de avaliação das síndromes positiva e negativa para a esquizofrenia no Brasil**. [s.l.] Escola Paulista de Medicina, 1993.

WADDINGTON, J. L. Schizophrenia: developmental neuroscience and pathobiology. **Lancet**, v. 341, p. 531–536, 1993.

WALTHER, S. et al. Resting state cerebral blood flow and objective motor activity reveal basal ganglia dysfunction in schizophrenia. **Psychiatry research**, v. 192, n. 2, p. 117–24, 31 maio 2011.

WANG, X. et al. Sodium nitroprusside treatment for psychotic symptoms and cognitive deficits of schizophrenia: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Psychiatry Research**, v. 269, p. 271–277, nov. 2018a.

WANG, X. et al. Sodium nitroprusside treatment for psychotic symptoms and cognitive deficits of schizophrenia: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Psychiatry Research**, v. 269, p. 271–277, 1 nov. 2018b.

WANG, Z. et al. Empirical optimization of ASL data analysis using an ASL data processing toolbox: ASLtbx. **Magnetic resonance imaging**, v. 26, n. 2, p. 261–9, 1 fev. 2008.

WEBER, H. et al. The genetic contribution of the NO system at the glutamatergic post-synapse to schizophrenia: Further evidence and meta-analysis. **European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology**, p. 1–21, 27 set. 2013.

WEI, J. et al. Nitrates for stable angina: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. **International journal of cardiology**, v. 146, n. 1, p. 4–12, 7 jan. 2011.

WEINBERGER, D. R. Implications of normal brain development for the pathogenesis of schizophrenia. **Archives of general psychiatry**, v. 44, p. 660–669, 1987.

WEINBERGER, D. R. On the plausibility of “the neurodevelopmental hypothesis” of schizophrenia. **Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 14, p. 1S-11S, 1996.

WINK, D. A. et al. Nitric oxide protects against cellular damage and cytotoxicity from reactive oxygen species. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, p. 9813–9817, 1993.

WINK, D. A.; MITCHELL, J. B. Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. **Free radical biology & medicine**, v. 25, p. 434–456, 1998.

WISENBERG, G. et al. Sustained effect of and lack of development of tolerance to

controlled-release isosorbide-5-mononitrate in chronic stable angina pectoris. **The American journal of cardiology**, v. 64, n. 10, p. 569–76, 15 set. 1989.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The World health report : 2001 : Mental health : new understanding, new hope**. Geneva: [s.n.].

WU, H. H.; WAID, D. K.; MCLOON, S. C. Nitric oxide and the developmental remodeling of retinal connections in the brain. **Progress in brain research**, v. 108, p. 273–86, jan. 1996.

YAMADA, K. et al. The role of nitric oxide in dizocilpine-induced impairment of spontaneous alternation behavior in mice. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 276, n. 2, p. 460–6, mar. 1996.

ZERBIN-RÜDIN, E.; KENDLER, K. S. Ernst Rüdin (1874–1952) and his genealogic-demographic department in Munich (1917–1986): An introduction to their family studies of schizophrenia. **American Journal of Medical Genetics**, v. 67, n. 4, p. 332–337, 26 jul. 1996.

ZHU, J. et al. Altered resting-state cerebral blood flow and its connectivity in schizophrenia. **Journal of Psychiatric Research**, v. 63, p. 28–35, abr. 2015.

TABLES AND FIGURES

Figure 1. Study Design. All patients underwent weekly psychometric assessments, and three cognitive assessments besides three functional neuroimaging scans;

with three main evaluation time-points: baseline (T0), 4 weeks of treatment, before crossover (T1), and 8 weeks of treatment, end of treatment.

Flow Diagram

Figure 2. Consolidated Standards of Reporting Trials Patient Flow Chart.

Figure 3. PANSS Total. Paired sample t-test. Asterisks indicate statistically significant P values. Week 3: $t = 2.25$; $df = 20$; $p < 0.036$. Week 4: $t = 2.05$; $df = 19$; $p < 0.05$. Error bars represent standard errors.

Figure 4. PANSS Positive Symptoms. Paired sample t-test. Asterisks indicate statistically significant P values. Week 3: $t = 2.14$; $df = 20$; $p < 0.045$. Week 4: $t = 2.26$; $df = 19$; $p < 0.018$. Error bars represent standard errors.