ALINE SIQUEIRA FERREIRA

**Uso contínuo de antipsicóticos modula fosfolipase A₂ e glicogênio
sintase quinase-3 beta em plaquetas de pacientes com Esquizofrenia**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Ciências

Programa de Fisiopatologia Experimental

Orientador: Prof. Dr. Wagner Farid Gattaz

São Paulo
2011

ALINE SIQUEIRA FERREIRA

**Uso contínuo de antipsicóticos modula fosfolipase A₂ e glicogênio
sintase quinase-3 beta em plaquetas de pacientes com Esquizofrenia**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Ciências

Programa de Fisiopatologia Experimental

Orientador: Prof. Dr. Wagner Farid Gattaz

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 5890, de 20 de dezembro de 2010.

A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

São Paulo
2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Ferreira, Aline Siqueira

Uso contínuo de antipsicóticos modula fosfolipase A₂ e glicogênio sintase quinase-3 beta em plaquetas de pacientes com Esquizofrenia / Aline Siqueira Ferreira. -- São Paulo, 2011.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Fisiopatologia Experimental.
Orientador: Wagner Farid Gattaz.

Descritores: 1.Esquizofrenia 2.Fosfolipases A₂ 3.Glicogênio sintase quinase 3
4.Plaquetas

USP/FM/DBD-319/11

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

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

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

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

Dedico essa tese à minha família,
Pai, Mãe, Diogo, Paulinho, Lú e Monique,
com todo meu amor e minha gratidão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Professor Gattaz pela oportunidade de desenvolver esse trabalho, ensinamentos transmitidos, atenção e confiança depositada, que contribuíram muito para o meu amadurecimento científico.

À Dr^a Nádia Raposo, minha co-orientadora e exemplo profissional, cuja contribuição foi imprescindível para a realização desse trabalho.

Ao Dr Paulo Sallet pela preciosa ajuda, especialmente na etapa final. Muito obrigada pela disponibilidade para a correção da tese e ensinamentos.

Aos médicos Dr Martinus Th van der Bilt, Dr Rodrigo Machado-Vieira e Dr Paulo Sallet, pelo apoio, recrutamento e avaliação dos pacientes e controles.

Ao Grupo de Psicoses do LIM-27, pela acolhida, valiosa ajuda no recrutamento dos pacientes e discussões científicas.

À farmacêutica Maria de Fátima Castanheira, pela presteza e boa vontade no fornecimento das listas de pacientes do IPq para o recrutamento.

Aos médicos assistentes do IPq, pelo auxílio no recrutamento dos pacientes.

À equipe de Enfermagem do IPq, fundamental para o processo de recrutamento dos pacientes. Em especial, aos queridos Norma Aparecida da Silva, Vilson Castro de Oliveira, José Antônio dos Reis e enfermeiro Felipe Takahashi, pela importante ajuda, conversas e agradável convívio.

À Dra Elida Ojopi, M.Sc. Leda Talib e Dr Daniel Kerr, responsáveis pela parte de genética contemplada no auxílio FAPESP.

Aos pacientes e seus familiares, por aceitarem participar da pesquisa.

À Gisele Deise Silva, Kátia Moreira e Vinicius Ribeiro pelo auxílio no recrutamento dos sujeitos controle.

À Tânia Regina de Souza e Zelinda Garcia pelo carinho, presteza, agradável convívio e valiosa ajuda.

Aos colegas do LIM-27, pelo convívio e aprendizado.

À querida amiga Eliza Ikenaga, pela ajuda incondicional e despretensiosa, na bancada e fora dela, carinho e amizade. À querida amiga Sandra Cardoso, por todo o carinho, ajuda e conversas sempre agradáveis.

Às amigas Karisa Belotto e Maria Rita Machado-Vieira, pelo carinho, amizade, conversas e bons momentos. À Edivani Pereira e Luciana Rodrigues, por todo o auxílio no Laboratório.

Aos membros da banca do exame de qualificação, Dr^a Cintia Fridman Rave, Dr Paulo Sallet e Dr Rodrigo Machado-Vieira, pela leitura criteriosa e valiosos ensinamentos e correções.

Às queridas Fátima Frizeiro, Prof^a Elizabeth Chicourel (UFJF) e Annelisa Farah, pelo carinho, apoio e torcida, mesmo distantes.

Às queridas Camila Monteiro e Maria Inês Roland, pela amizade, companhia, almoços, suporte, conselhos, e por aliviarem a distância da família. Também à Danise Benini, Fernanda Carvalho e Patrícia Defilippo pela amizade, alegrias e ótimos momentos. Adoro vocês!

Aos meus pais, Cacá e Paulo, por tudo. Ao Diogo, pelo amor, carinho, paciência e suporte. Ao Paulinho e à Monique, pela acolhida em Campinas, apoio, e conselhos; e também ao meu afilhado Lucas que está a caminho, por renovar a esperança. À Lú, pela amizade, motivação e exemplo.

A Deus, por me acompanhar, proteger e iluminar o meu caminho, sempre.

APOIO FINANCEIRO

Esta tese foi desenvolvida com o auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (processo 2009/05606-6, Auxílio à Pesquisa) e da Coordenação de Apoio ao Pessoal de Nível Superior (CAPES) (DS, bolsa de doutorado).

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	6
2.1 Esquizofrenia: conceitos	6
2.2 Aspectos epidemiológicos da esquizofrenia	8
2.3 Tratamento medicamentoso da esquizofrenia	9
2.4 Estresse oxidativo, inflamação e esquizofrenia	15
2.5 Farmacoeconomia da esquizofrenia	17
2.6 Biomarcadores	20
2.6.1 Fosfolipases A ₂	23
2.6.1.1 Características	23
2.6.1.2 Subtipos de PLA ₂ e inibidores	25
2.6.1.2.1 PLA ₂ intracelular independente de cálcio (iPLA ₂)	25
2.6.1.2.2 PLA ₂ citosólica dependente de cálcio (cPLA ₂)	26
2.6.1.2.3 PLA ₂ extracelular dependente de cálcio (sPLA ₂)	27
2.6.1.2.4 Outros subtipos de PLA ₂	29
2.6.1.2.5 Inibidores de PLA ₂	29
2.6.1.3 Metabolismo de lípides bioativos	30
2.6.1.4 PLA ₂ e esquizofrenia	32
2.6.1.4.1 Estudos em tecido cerebral	34
2.6.1.4.2 Estudos em matrizes periféricas	35

2.6.1.4.3 PLA ₂ e antipsicóticos	36
2.6.1.5 PLA ₂ e outros transtornos psiquiátricos	37
2.6.2 Glicogênio sintase quinase- 3 beta	39
2.6.2.1 Características	39
2.6.2.2 A via de sinalização <i>Wnt</i>	40
2.6.2.3 GSK-3B e esquizofrenia.....	42
2.6.2.3.1 Estudos em tecido cerebral.....	42
2.6.2.3.2 Estudos em matrizes biológicas periféricas	45
2.6.2.3.3 GSK-3B e antipsicóticos	47
2.6.2.4 GSK-3B e outros transtornos psiquiátricos	49
2.7 Escala de avaliação das síndromes positiva e negativa	49
3 OBJETIVOS.....	52
3.1 Geral	52
3.2 Específicos.....	52
4 MÉTODOS.....	53
4.1 Recrutamento dos grupos de pesquisa.....	56
4.1.1 Pacientes inicialmente livres de tratamento medicamentoso aos quais foi prescrita a olanzapina ou o haloperidol.....	56
4.1.1.1 Olanzapina.....	56
4.1.1.2 Haloperidol.....	57
4.1.2 Pacientes crônicos medicados e grupo controle.....	57
4.1.2.1 Clozapina e Olanzapina	57
4.1.2.2 Haloperidol em regime de monoterapia ou em associação com outro antipsicótico de primeira geração	58

4.1.2.3 Controles.....	58
4.2 Critérios de inclusão e de exclusão	59
4.3 Preparo e acondicionamento das amostras	60
4.4 Dosagem de proteínas.....	62
4.5 Determinação da atividade de subtipos da enzima fosfolipase A ₂	62
4.6 Determinação dos níveis de GSK-3 beta total e fosforilada (Ser9).....	65
4.7 Análise estatística	67
5 RESULTADOS.....	70
5.1 Características sócio-demográficas e clínicas dos participantes	70
5.2 Atividade de subtipos de fosfolipase A ₂	75
5.2.1 Pacientes livres de tratamento medicamentoso e grupo controle	75
5.2.2 Efeitos dos antipsicóticos sobre a atividade dos subtipos da fosfolipase A ₂	79
5.2.2.1 Pacientes livres de tratamento medicamentoso e após o uso de olanzapina ou haloperidol por 8 semanas.....	79
5.2.2.2 Pacientes crônicos medicados e grupo controle	84
5.3 Determinação dos níveis de GSK-3 beta total e fosforilada (Ser9).....	86
5.3.1 Pacientes livres de tratamento medicamentoso e grupo controle	86
5.3.2 Efeitos dos antipsicóticos sobre o nível e razão de glicogênio sintase quinase-3 beta	90
5.3.2.1 Pacientes livres de tratamento medicamentoso e após o uso de olanzapina ou haloperidol por 8 semanas.....	90
5.3.2.2 Pacientes crônicos medicados e grupo controle	95
5.4 Correlações entre as variáveis quantitativas estudadas	97

5.4.1 Pacientes crônicos medicados.....	97
5.4.1.1 Correlações observadas com os pacientes reunidos em um único grupo.....	97
5.4.1.2 Correlações observadas em cada grupo de pacientes	99
5.4.1.2.1 Clozapina	99
5.4.1.2.2 Olanzapina	100
5.4.1.2.3 Haloperidol	100
5.4.2 Pacientes livres de tratamento medicamentoso e após o uso de olanzapina ou haloperidol por 8 semanas.....	100
5.4.2.1 Correlações observadas em cada grupo de pacientes	100
5.4.2.1.1 Olanzapina	100
5.4.2.1.2 Haloperidol	101
5.5 Análise discriminante	101
5.5.1 Entre os três grupos de pacientes crônicos medicados	101
5.5.2 Entre o grupo de pacientes crônicos medicados como um todo e o grupo controle	102
6 DISCUSSÃO	104
7 CONCLUSÕES	121
ANEXO – Fluxograma do recrutamento dos pacientes crônicos medicados em uso de haloperidol.....	122
8 REFERÊNCIAS	124
Apêndice A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	
Apêndice B – Aprovação dos projetos de Pesquisa pela CAPPesq	
Apêndice C – Escala de Avaliação das Síndromes Positiva e Negativa	

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Via <i>Wnt</i> em indivíduos com esquizofrenia, sem tratamento medicamentoso.....	107
Figura 2. Via <i>Wnt</i> em indivíduos saudáveis ou com esquizofrenia em uso de antipsicóticos	109

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características sócio-demográficas dos pacientes participantes desse estudo, avaliados em dois momentos	70
Tabela 2 – Características sócio-demográficas dos participantes do braço transversal do estudo.....	71
Tabela 3 – Características clínicas dos pacientes crônicos medicados, participantes dessa pesquisa.....	74

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Pontuações nas sub-escalas (A) e total (B) da Escala de Síndromes Positiva e Negativa dos pacientes participantes desse estudo, de acordo com o antipsicótico prescrito.....	73
Gráfico 2. Atividade do subtipo iPLA ₂ nos pacientes livres de tratamento medicamentoso com 5 anos de doença (esquizofrenia) (D+5a) e menos de 6 meses de aparecimento dos sintomas psicóticos (D-6m) comparados com o grupo controle	76
Gráfico 3. Atividade do subtipo cPLA ₂ nos pacientes livres de tratamento medicamentoso com 5 anos de doença (esquizofrenia) (D+5a) e menos de 6 meses de aparecimento dos sintomas psicóticos (D-6m) comparados com o grupo controle	77
Gráfico 4. Atividade do subtipo sPLA ₂ nos pacientes livres de tratamento medicamentoso com 5 anos de doença (esquizofrenia) (D+5a) e menos de 6 meses de aparecimento dos sintomas psicóticos (D-6m) comparados com o grupo controle	78
Gráfico 5. Atividade de iPLA ₂ nos pacientes inicialmente livres de tratamento medicamentoso e após o uso de A) olanzapina ou B) haloperidol por 8 semanas (GL)	80
Gráfico 6. Atividade de cPLA ₂ nos pacientes inicialmente livres de tratamento medicamentoso e após o uso de A) olanzapina ou B) haloperidol por 8 semanas (GL)	81

Gráfico 7. Atividade de sPLA ₂ nos pacientes inicialmente livres de tratamento medicamentoso e após o uso de A) olanzapina ou B) haloperidol por 8 semanas (GL)	82
Gráfico 8. Comparação da atividade de iPLA ₂ nos pacientes inicialmente livres de tratamento medicamentoso e após o uso de olanzapina por 8 semanas – tratamento agudo, pacientes crônicos medicados com olanzapina – tratamento prolongado e o grupo controle	84
Gráfico 9. Atividade do subtipo iPLA ₂ nos diferentes grupos de pesquisa (GT)	85
Gráfico 10. Atividade do subtipo cPLA ₂ nos diferentes grupos de pesquisa (GT)	85
Gráfico 11. Atividade do subtipo sPLA ₂ nos diferentes grupos de pesquisa (GT)	86
Gráfico 12. Nível de glicogênio sintase quinase-3 beta total nos pacientes livres de tratamento medicamentoso com 5 anos de doença (esquizofrenia) (D+5a) e menos de 6 meses de aparecimento dos sintomas psicóticos (D-6m) comparados com o grupo controle	87
Gráfico 13. Nível de glicogênio sintase quinase-3 beta fosforilada nos pacientes livres de tratamento medicamentoso com 5 anos de doença (esquizofrenia) (D+5a) e menos de 6 meses de aparecimento dos sintomas psicóticos (D-6m) comparados com o grupo controle	88

Gráfico 14. Razão entre GSK-3B fosforilada e total nos pacientes livres de tratamento medicamentoso com 5 anos de doença (esquizofrenia) (D+5a) e menos de 6 meses de aparecimento dos sintomas psicóticos (D-6m) comparados com o grupo controle.....	89
Gráfico 15. Nível de glicogênio sintase quinase-3 beta total nas plaquetas dos pacientes inicialmente livres de tratamento medicamentoso e após 8 semanas de tratamento com A) olanzapina ou B) haloperidol (GL).....	91
Gráfico 16. Nível de glicogênio sintase quinase-3 beta fosforilada (Ser9) nas plaquetas dos pacientes inicialmente livres de tratamento medicamentoso e após 8 semanas de tratamento com A) olanzapina ou B) haloperidol (GL) .	92
Gráfico 17. Razão entre GSK-3B fosforilada e total, inferindo a porcentagem dessa enzima no estado inativo, nos pacientes inicialmente livres de tratamento medicamentoso e após tratamento por 8 semanas com A) olanzapina ou B) haloperidol.....	93
Gráfico 18. Comparação do nível de p(Ser9)-GSK-3B nos pacientes inicialmente livres de tratamento medicamentoso e após o uso de olanzapina por 8 semanas, pacientes crônicos medicados e o grupo controle.....	95
Gráfico 19. Nível de glicogênio sintase quinase-3 beta nos diferentes grupos de pesquisa (GT)	96
Gráfico 20. Razão entre GSK-3B fosforilada e total, inferindo a porcentagem dessa enzima no estado inativo, por grupos (GT)	97
Gráfico 21. Correlação entre sPLA ₂ e somatório geral da PANSS, quando avaliados todos os pacientes crônicos e medicados, participantes desse estudo	98

Gráfico 22. Correlação entre razão de GSK-3B e sub-escala negativa da PANSS, quando avaliados todos os pacientes crônicos e medicados, participantes desse estudo	99
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

^{31}P – MRS	espectroscopia de ressonância magnética do fósforo – 31
AA	ácido araquidônico
AACOF ₃	araquidonil trifluorometil cetona
Ac	anticorpo
AGE	ácido graxo essencial
Akt	proteína quinase B
AMPA	α -amino-3 hidroxi-5-metiloxazole-4-propionato
AP	antipsicótico
AP-1	<i>activator protein – 1</i>
APC	<i>adenomatous polyposis coli</i>
Asp	ácido aspártico
BEL	bromoenol lactone
BHT	hidroxitolueno butilado
Cl ₅₀	concentração que inibe 50 % da atividade enzimática
CLO	clozapina
COX	ciclooxigenase
CONT	controle
cPLA ₂	fosfolipase A ₂ citosólica dependente de cálcio
CREB	<i>cAMP response element-binding</i>
DAG	diacil glicerol
DHA	ácido docosa-hexanoico
DLPFC	córtex pré-frontal dorso-lateral
Dvl	<i>dishevelled</i>
EDTA	ácido etileno diamino tetracético
GI	graus de liberdade
GL	grupo longitudinal
GSH	glutathione
GSK-3A	glicogênio sintase quinase-3 alfa
GSK-3B	glicogênio sintase quinase-3 beta

GT	grupo transversal
HA	haloperidol
His	histidina
IC	intervalo de confiança
IFN-gama	interferon gama
IL	interleulina
Im	intramuscular
IP ₃	inositol 3 fosfato
iPLA ₂	fosfolipase A ₂ intracelular independente de cálcio
LTP	<i>long-time potentiation</i>
MAFP	metil-araquidonil flúor fosfato
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>
mRNA	ácido ribonucleico mensageiro
NC	não coletado
NMDA	N-metil-D-aspartato
Nrf2	<i>nuclear related fator-2</i>
OLA	olanzapina
p	significância do teste
PAF	fator de ativação de plaquetas
PANSS	Escala de Avaliação das Síndromes Positiva e Negativa
p(Ser9)-GSK-3B	glicogênio sintase quinase-3 beta fosforilada
PI3K	fosfoinositol-3 quinase
PIC	coquetel inibidor de protease
PKC	proteína quinase C
PLA ₂	fosfolipase A ₂
PLC	fosfolipase C
PMSF	fluoreto de fenil metil sulfonil
PRP	plasma rico em plaquetas
PUFA	ácidos graxos poli-insaturados
QALY	<i>quality-adjusted life year</i>
RIPA	<i>radio immuno precipitation assay</i>
ROS	espécies reativas de oxigênio

SCID-I	<i>Structured Clinical Interview for DSM Disorders, Axis I</i>
SCID-I/ NP	<i>SCID-I, no patient version</i>
Ser9	resíduo de serina na 9 ^a posição
SNC	sistema nervoso central
SNP	polimorfismo de base única
SOD	superóxido dismutase
sPLA ₂	fosfolipase A ₂ extracelular dependente de cálcio
SR	substrato radioativo
TA	temperatura ambiente
TAB	transtorno afetivo bipolar
TCF/LEF	<i>T-cell factor/ lymphoid enhancer factor</i>
TLR4	<i>toll like receptor 4</i>
vo	via oral

LISTA DE SÍMBOLOS

~	aproximadamente
X^2	qui-quadrado
Ca^{2+}	cálcio
CPM	contagens por minuto
G	gravidade
kDa	quilo Dalton
qsp	quantidade suficiente para
v/ v	volume por volume

LISTA DE SIGLAS

APA	<i>American Psychiatry Association</i>
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CATIE	<i>Clinical Antipsychotic Trial on Intervention Effectiveness</i>
CID10	Classificação Internacional de Doenças 10 ^a edição
CUtLASS	<i>Cost Utility of the Latest Antipsychotics in Severe Schizophrenia</i>
DSM-IV	<i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th ed</i>
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
IPq	Instituto de Psiquiatria
LIM-27	Laboratório de Investigação Médica 27/ Lab. de Neurociências
OMS	Organização Mundial da Saúde
SUS	Sistema Único de Saúde

RESUMO

Ferreira AS. *Uso contínuo de antipsicóticos modula fosfolipase A₂ e glicogênio sintase quinase-3 beta em plaquetas de pacientes com Esquizofrenia* [tese de doutorado]. São Paulo: Faculdade de Medicina. Universidade de São Paulo: 2011.

Duas enzimas têm-se destacado como possíveis marcadores biológicos periféricos na esquizofrenia: a fosfolipase A₂ (PLA₂) e a glicogênio sintase quinase-3 beta (GSK-3B). Essas moléculas exercem importante influência na arquitetura e plasticidade celulares, na regulação de vias metabólicas comuns (metabolismo de fosfolípidos e via *Wnt*), em fatores de transcrição, na regulação de genes e na sobrevivência celular. Tais aspectos tornam pertinentes as investigações a respeito da possível participação dessas enzimas na fisiopatologia da esquizofrenia. Foi verificada a atividade de subtipos de PLA₂ (método radioenzimático: iPLA₂, cPLA₂ e sPLA₂) e os níveis de GSK-3B total (GSK-3Bt) e fosforilada [p(Ser9)-GSK-3B] (ELISA) em plaquetas de pacientes com esquizofrenia inicialmente livres de tratamento medicamentoso com média de 5 anos de doença (D+5a) (n=10), aos quais foi prescrita a olanzapina. Foi avaliado também um grupo de pacientes livres de tratamento medicamentoso com menos de 6 meses de sintomas psicóticos (D-6m) (n=6) aos quais foi posteriormente prescrito o haloperidol. Esses pacientes foram comparados com um grupo controle (n = 20) e avaliados longitudinalmente após o tratamento descrito por 8 semanas. Um grupo de 40 pacientes com esquizofrenia (tempo médio da doença: 17 anos) com pelo menos 6 meses de tratamento com antipsicótico (clozapina, olanzapina ou haloperidol) foi ainda avaliado. Os sintomas clínicos foram avaliados por meio da Escala de Avaliação das Síndromes Positiva e Negativa (PANSS). Quando comparado com o grupo controle, os pacientes D+5a apresentaram aumento da atividade de iPLA₂ (p<0,01) e os pacientes D-6m apresentaram aumento da atividade de sPLA₂ (p<0,05). Na avaliação longitudinal, somente a olanzapina diminuiu a atividade de iPLA₂, cPLA₂ e sPLA₂ (p<0,01). Quando comparada a atividade dos subtipos de PLA₂ entre os pacientes medicados a pelo menos 6 meses e o grupo controle, não foram observadas diferenças significativas. Quando comparado com o grupo controle, os pacientes D+5a apresentaram diminuição dos níveis de GSK-3Bt e p(Ser9)-GSK-3B (p<0,05). Na avaliação longitudinal, foi observado que somente a olanzapina aumentou os níveis de GSK-3Bt e p(Ser9)-GSK-3B (p < 0,01). Quando comparados os níveis de GSK-3Bt e p(Ser9)-GSK-3B entre os pacientes medicados a pelo menos 6 meses e o grupo controle não foram observadas diferenças significativas. Para os pacientes medicados a pelo menos 6 meses foram observadas correlações entre a sub-escala negativa da PANSS e os níveis de p(Ser9)-GSK-3B (r=,53, p<0,001). Sugere-se que a medicação module PLA₂ e GSK-3B, independente do antipsicótico utilizado. Esses resultados apontam para uma futura aplicação dessas enzimas na verificação de adesão ao tratamento e estabilização do quadro clínico.

Descritores: Esquizofrenia; Fosfolipases A₂; Glicogênio sintase quinase 3; Plaquetas.

SUMMARY

Ferreira AS. *Antipsychotics prolonged use modulates phospholipase A₂ and glycogen synthase kinase-3 beta in platelets from patients with Schizophrenia* [doctoral thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina. Universidade de São Paulo: 2011.

The enzymes phospholipases A₂ (PLA₂) and glycogen synthase kinase-3 beta (GSK-3B) are thought to play a role in schizophrenia by influencing cellular architecture and plasticity, common signaling pathways (phospholipids metabolism and Wnt pathway), gene transcription, regulation factors and apoptosis. These aspects motivated the investigation of both these enzymes in schizophrenia. The activities of PLA₂ subtypes (iPLA₂, cPLA₂ and sPLA₂ by radio enzymatic method) and the levels of total GSK-3B and phosphorylated GSK-3B [p(Ser9)-GSK-3B] (by immune enzyme assay) were performed in platelets of drug free patients with schizophrenia for average 5 years of disease (D+5y) (n=10), who was lately prescribed with olanzapine and in drug naïve patients with less than 6 months of psychotic symptoms (D-6m) who was lately prescribed with haloperidol. These patients were compared to a control group (n=20) and were longitudinally evaluated after 8 weeks of monotherapy treatment with the prescribed antipsychotic. These enzymes were also investigated in a group of 40 patients with schizophrenia (mean duration of disease: 17 years) who were at least 6 months treated with antipsychotic (clozapine; olanzapine or haloperidol). Psychopathology was assessed with the Positive and Negative Syndrome Scale (PANSS). Patients D+5y presented higher iPLA₂ activity than control group ($p < 0.01$) and patients D-6m presented higher sPLA₂ activity than control group ($p < 0.05$). On longitudinal evaluation, only olanzapine decreased iPLA₂, cPLA₂ and sPLA₂ activities ($p < 0.01$). In the long-term medicated patients group compared to the control group, no differences regarding PLA₂ subtype activity were found. Patients D+5y presented lower GSK-3Bt and p(Ser9)-GSK-3B levels than control group ($p < 0.05$). On longitudinal evaluation, only olanzapine increased GSK-3Bt and p(Ser9)-GSK-3B levels ($p < 0.01$). In the long-term medicated patients group compared to the control group, no differences regarding GSK-3B levels were found. For long-term medicated patients, it was observed correlation between p(Ser9)-GSK-3B and the PANSS negative syndrome subscale score ($r = .53$, $p < 0.001$). It was suggested that antipsychotic treatment modulated PLA₂ and GSK-3B, in spite of the drug used. The results pointed to a future use of these enzymes to verify drug treatment compliance and clinical stabilization.

Descriptors: Schizophrenia; Phospholipases A₂; Glycogen synthase kinase 3; Platelets.

1 INTRODUÇÃO

Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) sugerem que os transtornos neurológicos e psiquiátricos são uma importante causa no aumento da morbidade em todo o mundo. Mais de 450 milhões de pessoas são afetadas pela mudança significativa provocada por estas doenças no comportamento e na mente destes indivíduos (Mathers et al., 2006).

A esquizofrenia é um transtorno mental grave que afeta principalmente adultos com idade entre 15–35 anos e, devido a sua cronicidade, tem elevada prevalência. Atinge aproximadamente 50 milhões de pessoas no globo, sendo que mais da metade destas não recebe os cuidados apropriados. Apesar de tratável, o tratamento é mais efetivo se realizado nos estágios iniciais. Este tratamento compreende a medicação adequada e o envolvimento da família e da comunidade. Destaca-se que 90 % dos indivíduos com esquizofrenia que não recebem o tratamento adequado residem em países em desenvolvimento, nos quais se enquadra o Brasil (WHO, 2011a).

A esquizofrenia apresenta diversos aspectos etiopatogênicos, podendo ser genéticos, ambientais, neurodesenvolvimentais, neurodegenerativos, estruturais e bioquímicos (Jardim, 2005). Estudar alterações nestes aspectos constitui uma promissora solução para a detecção precoce e tratamento adequado, com maior sucesso, desta

patologia. Nesse sentido, destaca-se a busca por possíveis biomarcadores que reflitam algum desses aspectos.

A utilização da enzima fosfolipase A_2 (PLA₂) como um possível biomarcador periférico para esquizofrenia é bastante estudada devido à sua função no metabolismo dos fosfolípides. Elevações nos níveis enzimáticos de PLA₂ total na membrana plaquetária (Gattaz et al., 1987) e no soro (Gattaz et al., 1990) de pacientes com esquizofrenia já foram descritos anteriormente (Gattaz et al., 1987; 1990; 1995; Ross et al., 1997; Ross, 2003). Smesny et al. (2005) sugerem aumento dos níveis de PLA₂ intracelular independente de cálcio (iPLA₂) em amostras de soro de pacientes com esquizofrenia. Talib (2006) descreveu metodologia apropriada para a determinação da atividade enzimática dos subtipos de PLA₂ [secretória, citosólica e independente de cálcio (Ca²⁺)] em plaquetas. Cabe ressaltar que esta enzima (PLA₂ total) está alterada em outras patologias, tais como transtorno afetivo bipolar (TAB), depressão e doença de Alzheimer (Gattaz et al., 1996; Bennett; Horrobin, 2000; Farooqui et al., 2000a). Isto posto, é preciso esclarecer o real papel de cada subtipo enzimático, sua provável correlação com estes transtornos psiquiátricos e, principalmente, se existe especificidade de cada subtipo para cada patologia.

A proteína glicogênio sintase quinase-3 beta (GSK-3B) é uma quinase que fosforila serinas e treoninas e exerce grande influência na arquitetura e plasticidade celulares, na regulação de diversas vias, em fatores de transcrição e regulação de genes, na apoptose, na sobrevivência celular, na

coordenação da polarização neuronal, no controle da reorganização do citoesqueleto e na distribuição de proteínas (Frame; Cohen, 2001; Grimes; Joep, 2001; Nadri et al., 2002; Kim et al., 2011). Esta enzima é secretada na via de sinalização *Wnt*, envolvida em importantes aspectos neuronais, dentre estes, a formação de sinapses (Lovestone et al., 2007). A GSK-3B é uma enzima relacionada a defeitos da arquitetura celular observados na esquizofrenia (Kozlovsky et al., 2002). Alguns estudos sugerem que a diminuição da fosforilação (ou seja, aumento da atividade de GSK-3B) da GSK-3B esteja associada com a hipótese do neurodesenvolvimento na esquizofrenia (esta se refere a alterações na proliferação de neurônios e glia, migração celular, diferenciação morfológica e bioquímica e formação de sinapses) (Lovestone et al., 2007). Emamian et al. (2004) observaram uma diminuição relativa de GSK-B fosforilada no resíduo de serina na 9ª posição amino-terminal [p(Ser9)-GSK-3B] em linfócitos e córtex frontal de pacientes com esquizofrenia quando comparados aos sujeitos controles. No entanto, Kozlovsky et al. (2005) relacionaram baixos níveis dessa proteína como uma consequência tardia de um insulto perinatal na esquizofrenia, resultado de trabalhos que observaram uma diminuição de níveis de GSK-3B em córtex pré-frontal (Kozlovsky et al., 2000) de pacientes com esquizofrenia, quando comparados aos sujeitos controle. Sendo assim, dados sobre a atividade de GSK-3B em pacientes com esquizofrenia são ainda controversos e informações sobre a influência do tratamento medicamentoso nesta enzima estão disponíveis somente em animais.

Embora o tratamento medicamentoso da esquizofrenia tenha avançado significativamente com a introdução da clorpromazina em 1952, os 62 fármacos com ação antipsicótica hoje disponíveis no mercado ainda apresentam mecanismos de ação com eficácia clínica parcial, sendo frequentemente necessária a associação de fármacos, além da ocorrência de graves efeitos colaterais (Tandon et al., 2008). No Brasil, os antipsicóticos de 1ª geração, sendo o haloperidol o fármaco mais prescrito, estão indicados como tratamento de primeira escolha, especialmente devido à sua maior disponibilidade nas unidades básicas de saúde, com menor custo comparativo para o Sistema Único de Saúde (SUS). Entretanto, a suposta superioridade dos fármacos de 2ª geração faz com que muitas vezes estes sejam os fármacos de 1ª escolha. No entanto, estudos recentes (*Clinical Antipsychotic Trial on Intervention Effectiveness – CATIE*, nos Estados Unidos e *Cost Utility of the Latest Antipsychotics in Severe Schizophrenia – CUtLASS*, no Reino Unido) apontam para eficácia semelhante entre esses fármacos, quando avaliadas a qualidade de vida e a psicopatologia dos pacientes (Lieberman et al., 2005; Jones et al., 2006; Tandon et al., 2008).

Nesse contexto, a principal motivação deste projeto foi o estudo de alterações neuroquímicas relacionadas à esquizofrenia e os efeitos do uso contínuo de antipsicóticos com diferentes perfis farmacológicos sobre a atividade dos subtipos de PLA₂ e os níveis de GSK-3B total e fosforilada, utilizando plaquetas como modelo periférico do neurônio. Plaquetas compartilham uma série de características com os neurônios, tais como

síntese e liberação de neurotransmissores. Ressalta-se que na literatura não são encontradas medidas concomitantes de fosfolipases A_2 e glicogênio sintase quinase-3B em plaquetas, o que denota o caráter inédito do presente estudo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Esquizofrenia: conceitos

A Esquizofrenia pode ser descrita como um transtorno psiquiátrico caracterizado por distorções fundamentais e características do pensamento e da percepção e por afeto inadequado ou embotado. A consciência clara e a capacidade intelectual costumam ser mantidas, embora certos déficits cognitivos possam surgir no curso da doença (DSM-IV-TRTM, *American Psychiatry Association* – APA, 2002). Uma das formas de classificar seus sintomas característicos é a divisão em duas amplas categorias – sintomas positivos e negativos – com uma terceira categoria, desorganizada, mais recentemente admitida, pois análises estatísticas revelaram que esta é uma dimensão independente da categoria de sintomas positivos, na qual estava anteriormente incluída. Os sintomas positivos incluem delírios e alucinações. Os desorganizados incluem fala desorganizada (transtorno do pensamento), comportamento desorganizado e atenção comprometida. Os sintomas negativos incluem nível e intensidade restritos de expressão emocional (embotamento afetivo), pensamento e produtividade da fala reduzidos, anedonia e avolição (APA, 2002).

Nenhuma lesão ou funcionamento inapropriado isolados são responsáveis por causar esquizofrenia. Sinalização aberrante, múltiplos fatores genéticos e ambientais aparentemente determinam, de forma conjunta, a causa desse transtorno (Beasley et al., 2001; Kozlovsky et al.,

2002). Uma série de estudos de neuroimagem e neuropatológicos apoiam a hipótese de que a esquizofrenia pode ser um transtorno do neurodesenvolvimento associada com migração celular alterada durante a vida fetal ou período embrionário (Weinberger, 1987; Pearlson, 2000). Desta forma, moléculas ou mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento fisiológico do cérebro podem estar envolvidos na patogênese da esquizofrenia (Durany; Thome, 2004; Shoval; Weizman, 2005).

A décima edição da Classificação Internacional das Doenças (CID10) (OMS, 1998) e a quarta edição do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-IV-TR™) (APA, 2002) estabelecem os critérios diagnósticos atualmente aplicados. Nas duas classificações, o diagnóstico diferencial é baseado nos sintomas manifestados e na sua duração, bem como na diferenciação entre transtornos afetivos e outros transtornos psicóticos orgânicos ou induzidos por substâncias.

A esquizofrenia é uma doença multifatorial, com elevada predisposição genética e também influência significativa de fatores ambientais. As principais variações e polimorfismos gênicos associados à esquizofrenia são aquelas encontradas nos genes da catecol-O-metil-transferase (*COMT*), neuregulina 1 (*NRG1*), *disrupted in schizophrenia 1* (*DISC1*) e 2 (*DISC2*), *dystrobrevin-binding protein 1* (*DTNBP1*), regulador da sinalização da proteína-G 4 (*RGS4*), prolina desidrogenase (*PRODH*), receptor 2A de serotonina e receptor D₃ de dopamina (*DRD3*), embora estes não sejam necessários nem são suficientes (Fatemi; Folsom, 2009; Mikkelsen et al., 2010).

É bem estabelecida a grande influência dos fatores ambientais no desenvolvimento de transtornos psiquiátricos, incluindo a esquizofrenia (Schwarz; Bahn, 2008). Esses fatores incluem complicações peri-natais e obstétricas, infecções virais e desnutrição durante a gestação, incompatibilidade de fator Rh, autoimunidade devido a doenças infecciosas, migrações e uso de *Cannabis sativa* L. (Fatemi; Folsom, 2009).

2.2 Aspectos epidemiológicos da esquizofrenia

A OMS divide a prevalência da esquizofrenia de acordo com o desenvolvimento do país. Para os países em desenvolvimento, dentre os quais se enquadra o Brasil, a prevalência é de 13,1/ 1.000 pessoas até 59 anos e de 1,0/ 1.000 pessoas a partir de 60 anos (dados referentes ao ano de 2004) (WHO, 2011b). Países desenvolvidos tendem a apresentar maior prevalência para a esquizofrenia (Saha et al., 2005).

No Brasil, são escassos os estudos epidemiológicos sobre a esquizofrenia. Menezes et al. (2007) estimaram a incidência anual de psicoses de primeiro contato em 10,1/ 100.000 para psicoses não afetivas e de 5,8/ 100.000 para psicoses afetivas. Essas taxas diminuem com o aumento da idade. Esse estudo foi realizado na região da Grande São Paulo e envolveu 926.081 pessoas com idade entre 18 e 64 anos; os cálculos foram baseados nos dados da contagem censitária realizada no ano de 2000. Um estudo de prevalência de transtornos psiquiátricos, realizado em três instituições localizadas na região metropolitana de Recife,

envolvendo 319 institucionalizados, apontou a esquizofrenia como o transtorno mais prevalente, com 51 % dos casos, seguida do alcoolismo (14 %) (Paixão et al., 2009). A taxa de mortalidade em pacientes portadores de psicoses não afetivas foi 8,4 vezes maior [intervalo de confiança (IC) 95% = 4,0 – 15,9] do que o esperado na população e 317,9 vezes maior, devido ao suicídio (IC95% = 125,2 – 668,3), em um estudo conduzido na cidade de São Paulo com uma amostra de 120 pacientes (Menezes; Mann, 1996).

2.3 Tratamento medicamentoso da esquizofrenia

Essa subseção foi baseada no *guideline* publicado pela *American Psychiatry Association*, de autoria de Lehman et al. (2004), com uma breve atualização de Dixon et al. (2009).

A clorpromazina, cujo efeito antipsicótico foi descoberto acidentalmente – estava sendo testada como “coquetel lítico” no preparo de pacientes para a cirurgia – foi adotada como tratamento medicamentoso para esse transtorno a partir de 1952. Em seguida, estudos demonstraram que a sua eficácia se relacionava com o bloqueio dos receptores dopaminérgicos, principalmente D_2 (Laborit; Huguenard, 1951; Kapur; Mamo, 2003; Lehman et al., 2004).

Na fase aguda, o objetivo do tratamento é a redução dos sintomas, a prevenção de danos advindos de auto ou heteroagressividade e a melhora do comportamento social do indivíduo; circunstância em que os medicamentos sedativos são mais indicados. Na fase de manutenção, o

objetivo é manter o paciente assintomático, melhorar a funcionalidade, a qualidade de vida e reduzir recaídas. Quando o paciente não responde a dois ou três tratamentos convencionais (doses plenas por pelo menos seis semanas) nos cinco anos precedentes, é caracterizada a refratariedade, que corresponde a aproximadamente 30 % (IC95% = 10 – 45 %) dos casos (Wannmacher, 2004). Entre os pacientes sem tratamento de manutenção, cerca de 60 a 70 % sofrem recaídas em um ano e cerca de 90 % em dois anos (Lehman et al., 2004).

Depois da descoberta da clorpromazina, outros fármacos com o mesmo perfil foram desenvolvidos. Estes medicamentos foram classificados como antipsicóticos de 1ª geração, típicos ou convencionais, devido às semelhanças no mecanismo de ação, eficácia e perfil de efeitos adversos (Lehman et al., 2004). Além dessa classe, há também os antipsicóticos de 2ª geração.

Embora atualmente existam propostas de se classificar os antipsicóticos de acordo com a sua ligação a receptores (Kim et al., 2006; Jindal; Keshavan, 2008), devido à heterogeneidade de mecanismos de ação dentro de cada classe, optou-se por utilizar nessa revisão a classificação em uso na literatura tradicional.

Os antipsicóticos de 1ª geração podem ser subdivididos em antipsicóticos de alta potência, como o haloperidol, que são associados a elevado bloqueio de receptores dopaminérgicos; e antipsicóticos de baixa potência ou sedativos, como a clorpromazina, os quais apresentam menor

ação bloqueadora dopaminérgica e maior propensão à indução de efeitos sedativos, hipotensores e autonômicos (Baldessarini; Tarazi, 2007).

Os antipsicóticos de 1ª geração são eficazes principalmente no controle dos sintomas positivos da esquizofrenia. No entanto, esses fármacos estão associados à elevada ocorrência de efeitos colaterais, com destaque para os sintomas extrapiramidais provocados pelo elevado bloqueio dos receptores dopaminérgicos, como a distonia aguda, a acatisia, o parkinsonismo, a síndrome neuroléptica maligna e a discinesia tardia (Adams et al., 2000). De Leon (2007) e Correll e Schenk (2008) não observaram diferença entre a prevalência de discinesia tardia dentre os pacientes em uso de antipsicóticos de 1ª ou 2ª geração, o que pode indicar que os efeitos extrapiramidais estão associados principalmente à dose e não ao tipo de antipsicótico.

Baixas doses de antipsicóticos de 1ª geração são associadas com aderência ao tratamento e melhor funcionalidade, além de menor risco de sintomas extrapiramidais. Antipsicóticos de 2ª geração podem ser administrados em doses maiores, pois seu “limiar” para o surgimento de sintomas extrapiramidais é maior. As vantagens da redução das doses de antipsicóticos para reduzir os efeitos colaterais devem ser balanceadas com a possibilidade de uma recaída ou exacerbação dos sintomas da esquizofrenia. Geralmente, opta-se por manter a estabilidade do paciente (Lehman et al., 2004).

Os antipsicóticos disponíveis possuem uma variedade de efeitos colaterais, incluindo efeitos neurológicos, metabólicos, sexuais, endócrinos,

sedativos e cardiovasculares. É fundamental que esses efeitos colaterais sejam monitorados durante todo o tratamento medicamentoso. Durante a fase de manutenção, é importante o monitoramento rotineiro dos efeitos extrapiramidais e da discinesia tardia. Devido ao risco de ganho de peso associado a vários antipsicóticos, medidas regulares do índice de massa corporal (IMC) são recomendadas, bem como o monitoramento de complicações relacionadas à obesidade (hipertensão arterial sistêmica, alterações do perfil lipídico, sintomas clínicos de diabetes) (Lehman et al., 2004).

Estimativas apontam que 20 % dos pacientes não respondem aos antipsicóticos de 1ª geração e que aproximadamente de 20 a 30 % dos pacientes que inicialmente responderam são passíveis de recaídas, mesmo com a manutenção da terapia antipsicótica. Assim, a despeito da eficácia das medicações antipsicóticas no tratamento da esquizofrenia, uma parcela expressiva dos pacientes apresenta psicopatologia clínica e prognóstico desfavorável em longo prazo (Lehman et al., 2004).

Uma nova classe de antipsicóticos, os denominados de 2ª geração, foi introduzida no mercado a partir de 1990, tendo como protótipo a clozapina. Essa molécula caracteriza-se por possuir atividade antagonista em diferentes receptores, incluindo os receptores de dopamina (D_1 , D_2 , D_3 , D_4 , D_5), serotonina ($5-HT_{1A}$, $5-HT_{2A}$, $5-HT_{2C}$), muscarínicos (M_1 , M_2 , M_3 , M_5), α_1 e α_2 adrenérgicos, e receptores histamínicos (H_1) (Lehman et al., 2004). A clozapina demonstrou possuir maior eficácia no tratamento dos sintomas positivos e negativos com menor incidência de efeitos

extrapiramidais, quando comparada aos antipsicóticos de 1ª geração. Entretanto, devido ao elevado risco de induzir agranulocitose (0,5 a 2 %), efeito adverso que pode ser fatal, sua utilização está restrita à pacientes refratários a outros antipsicóticos, com constante monitorização terapêutica (*Expert Consensus Treatment Guidelines for Schizophrenia*, 1999). A partir da estrutura da clozapina, pesquisas de novos fármacos foram realizadas, a fim de sintetizar novas moléculas com mecanismo de ação semelhante, mas que não induzissem discrasias sanguíneas (Geddes et al., 2000).

As possíveis vantagens em termos de eficácia e segurança dos antipsicóticos de 2ª geração são ainda uma questão a ser esclarecida com a condução de mais estudos. Na revisão sistemática conduzida por Geddes et al. (2000), foi avaliada a eficácia no controle dos sintomas psicóticos, o perfil dos efeitos adversos e a influência da dose nestes desfechos em estudos comparando os antipsicóticos. Foi observada discordância de achados entre os ensaios clínicos, mesmo entre aqueles que avaliaram os mesmos antipsicóticos; uma possível causa apontada foram as diferentes doses de antipsicótico de 1ª geração utilizadas como referência. Os antipsicóticos de 2ª geração foram mais eficazes somente quando as doses de antipsicóticos de 1ª geração foram maiores do que o equivalente a 12 mg de haloperidol/dia, provavelmente devido aos sintomas extrapiramidais induzidos por doses elevadas de antipsicóticos de 1ª geração. Sendo assim, não foram evidenciadas diferenças entre as duas classes de antipsicóticos em eficácia e segurança. Além disso, em outra revisão sistemática (Leucht et al., 2003), a superioridade dos antipsicóticos de 2ª geração foi modesta nas taxas de

recaída e não foi observada diferença em relação ao abandono do tratamento e efeitos adversos.

São bastante comuns a não adesão ao tratamento medicamentoso, as faltas às consultas médicas, o não relato de informações essenciais ao psiquiatra e também a recusa do tratamento prescrito. Para minimizar a falta de adesão é importante que seja feita uma contextualização do tratamento, pois a adesão depende da saúde e das convicções do paciente, dos potenciais benefícios e riscos e do apoio social. As causas frequentes da baixa adesão são a falta de *insight*, a ruptura da aliança com o médico, os fatores culturais, a falta do entendimento da necessidade do medicamento, mesmo na fase de manutenção, o comprometimento cognitivo e a experiência de efeitos colaterais desagradáveis, como a acatisia (Beck et al., 2011).

Medicamentos de outras classes farmacológicas são comumente prescritos a pacientes com esquizofrenia. Os benzodiazepínicos são utilizados no tratamento da catatonia e também para controle da ansiedade e agitação até ser observado o efeito terapêutico do antipsicótico. Os antidepressivos são utilizados no tratamento de comorbidades como depressão maior ou transtorno obsessivo compulsivo, apesar do risco da exacerbação de psicoses associado a alguns antidepressivos. Os estabilizadores de humor e os beta-bloqueadores são úteis para reduzir a hostilidade e agressividade recorrente. A interação entre fármacos deve ser constantemente monitorada, especialmente entre aqueles que são

metabolizados pelo sistema enzimático do citocromo P₄₅₀ (Lehman et al., 2004).

Ainda não há um consenso sobre qual o antipsicótico mais apropriado para cada paciente. O estudo de biomarcadores e o avanço de novas técnicas laboratoriais, integrado com maiores conhecimentos sobre a etiologia e a fisiopatologia da esquizofrenia, além da experiência clínica, poderão contribuir para a escolha terapêutica mais racional.

2.4 Estresse oxidativo, inflamação e esquizofrenia

O cérebro é particularmente suscetível ao estresse oxidativo, pois contém grandes quantidades de ácidos graxos poli-insaturados (PUFA), consome relativamente grandes quantidades de oxigênio para a produção de energia e tem baixa concentração de enzimas antioxidantes quando comparado a outros tecidos (Abibhatla; Hatcher, 2008; Bitanhirwe; Woo, 2011). Martínez-Gras et al. (2011) sugerem que a esquizofrenia esteja associada a um desequilíbrio sistêmico, com aumentos dos níveis plasmáticos de prostaglandinas pró-inflamatórias.

A hipótese clássica da dopamina na esquizofrenia postula uma hiperatividade da transmissão sináptica em receptores D₂ em nível subcortical, já que em nível de córtex frontal espera-se hipoatividade dopaminérgica associada com sintomas negativos. O metabolismo da dopamina origina peróxido de hidrogênio, e este, via auto-oxidação da dopamina, propicia a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS)

como dopamina quinonas e superóxido. Estas ROS podem consumir as enzimas antioxidantes, tais como a superóxido dismutase (SOD) e a glutathione peroxidase (GSH), diminuindo a quantidade disponível destas. Essa redução causa estresse oxidativo, tendo como possíveis consequências a morte celular, a peroxidação lipídica e as alterações nos níveis de óxido nítrico e de interleucinas (Hastings, 1995; Fleckestein et al., 2007; Bitanhirwe; Woo, 2011).

Evidências demonstraram que o tratamento prolongado com antipsicóticos potencializa as ações anti-inflamatórias do organismo, como aumento periférico da produção de receptor antagonista solúvel da interleucina 1, receptor solúvel de interleucinas 2 e 10, acompanhado de redução das citocinas pró-inflamatórias interleucinas 1B e 6, receptor solúvel de interleucina 6 e fator de necrose tumoral – alfa (TNF- α) (Meyer et al., 2011). Zhang et al. (2006) não observaram diferenças entre as atividades de SOD, GSH e catalase no plasma de pacientes com esquizofrenia, crônicos e medicados, quando estes foram tratados com antipsicóticos de 1ª ou de 2ª geração. Estes autores sugerem que o tratamento contínuo com ambas as classes de antipsicóticos produzam efeitos similares na atividade das enzimas antioxidantes e nos níveis de peroxidação lipídica.

As enzimas estudadas nesse projeto estão envolvidas com o processo inflamatório. Déficit de PUFA na membrana neuronal, devido à ação da PLA₂, resulta em falha no sistema antioxidante de defesa do organismo (Yao et al., 2003). Genc e Genc (2009) observaram que a GSK-3B inibe a

resposta celular antioxidante por meio da fosforilação direta que impede o fator de transcrição *nuclear related factor-2* (Nrf2) de entrar no núcleo da celular. Nrf2 protege neurônios, glia e endotélio do estresse oxidativo e da inflamação.

2.5 Farmacoeconomia da esquizofrenia

Lieberman et al. (2005) observaram, na 1ª fase do CATIE, que os pacientes alocados no grupo do antipsicótico perfenazina (1ª geração), em uma randomização duplo-cega, apresentaram taxa de descontinuação semelhante à observada com a quetiapina (2ª geração), risperidona (2ª geração) e ziprasidona (2ª geração). Somente a olanzapina (2ª geração) se mostrou mais efetiva, apesar do maior incremento de peso e dos níveis de glicose e de lípidos concomitantes. A perfenazina foi escolhida pelos pesquisadores como antipsicótico de 1ª geração, no lugar do haloperidol (1ª geração), devido a sua menor potência e perfil moderado de efeitos colaterais. Em um estudo posterior com esse mesmo grupo de pacientes, Rosenheck et al. (2006) observaram um incremento na qualidade de vida dos pacientes de todos os grupos, sendo a perfenazina mais eficaz do que a risperidona. Não foram observadas diferenças entre as pontuações da PANSS e da *quality-adjusted life year* (QALY) entre os pacientes que foram tratados com perfenazina comparados com os antipsicóticos de 2ª geração, com um custo mensal para os pacientes tratados com perfenazina 40 a 50 % menor quando comparado aos demais fármacos. Rosenheck (2005)

revisou os estudos que compararam a eficácia dos antipsicóticos de 2ª geração com os de antipsicóticos de 1ª geração. Foi apontada uma superestimação das vantagens dos antipsicóticos de 2ª geração (exceto a clozapina) e foi sugerido que os anticolinérgicos sejam associados aos antipsicóticos de 1ª geração nos próximos estudos de eficácia e custo-utilidade a serem realizados. O estudo CUtLASS (Jones et al., 2006), caracterizado por ser multi-cêntrico, cego, randomizado e controlado, conduzido no Reino Unido, também comparou a qualidade de vida (QALY) e o custo-utilidade dos antipsicóticos de 1ª e de 2ª geração e não observou diferença entre as duas classes quanto aos parâmetros avaliados.

No Brasil, Leitão et al. (2006) realizaram um estudo sobre os custos financeiros diretos da esquizofrenia. Esse estudo foi conduzido no estado de São Paulo, no ano de 1998, estimando-se que 75 % da população brasileira fosse assistida pelo SUS. Os custos referentes aos medicamentos foram calculados separadamente e estimados em US\$ 13.817.400 de um total de US\$ 191.781.327. Esse total de US\$ 191.781.327 foi dividido em 48,7 % devido às novas internações, 11,0 % do tratamento de pacientes ambulatoriais, 30,5 % aos pacientes de internação prolongada e 9,8 % aos pacientes sem tratamento regular. Um dado alarmante levantado (Leitão et al., 2006) se refere aos 71 % de pacientes com esquizofrenia que não estavam sendo tratados regularmente. Nessa porcentagem se encaixavam também os pacientes que nunca seriam assistidos por um psiquiatra, embora existisse esse profissional na unidade básica de saúde. Os gastos referentes a essa classe são devidos ao atendimento emergencial, por

exemplo. Outra ressalva realizada foi a de que os gastos com esquizofrenia no estado de São Paulo no ano de 1998 correspondeu a 2,2 % do total de gastos com a Saúde, porcentagem bem inferior à observada nos países desenvolvidos (7 – 12 %), o que ilustra a insuficiência de recursos alocados na Saúde Mental no Brasil.

Em outro estudo conduzido no Brasil, em Florianópolis (SC), os resultados do modelo de árvore de decisão sugerem que entre o haloperidol, olanzapina e risperidona, em um período de três meses quando não ocorrem trocas de medicação, a risperidona apresenta a melhor relação custo-utilidade, com resultados superiores ao haloperidol. Além disso, a risperidona apresenta utilidade semelhante à olanzapina, porém, com um custo inferior (Lidner, 2007).

Uma importante observação feita por Hansen et al. (2006) se refere ao fato de que os estudos de farmacoeconomia da esquizofrenia usualmente não incluem as intervenções não-médicas, como a psicoterapia, a terapia familiar e a reabilitação.

Há uma grande dificuldade em comparar os estudos de farmacoeconomia, porém deve-se destacar que o cuidado com pacientes internados representa o maior consumo nos custos diretos como uma tendência dos estudos. Além disso, um paciente não aderente à terapia medicamentosa pode dobrar o custo anual da sua assistência. Essas informações são fundamentais para os responsáveis por tomadas de decisão, pois a escolha por um novo tratamento mais eficaz, mesmo que mais caro, considerando a aderência terapêutica e a possibilidade de

prevenção de recaídas, pode apresentar maior custo-utilidade (Daltio et al., 2007). Esse raciocínio é reforçado por Buckley (1998), que recomendou o uso do medicamento menos deletério ao paciente sempre, independente do custo, mesmo que o novo fármaco seja somente um pouco superior ao antigo tratamento, como a excelência na terapia medicamentosa.

2.6 Biomarcadores

Marcadores biológicos, ou biomarcadores, são características avaliadas objetivamente como indicadores de processos biológicos ou patogênicos ou de resposta farmacológica a uma intervenção terapêutica (Frank; Hargreaves, 2003).

Para ser adequado à utilização na prática clínica, o biomarcador deve sempre ser escolhido baseado na sua aplicabilidade e facilidade de uso. Além disso, é importante realizar validações rigorosas da sua funcionalidade em estudos pré-clínicos e clínicos para que se tenha confiança nas medidas obtidas (Frank; Hargreaves, 2003). A identificação de biomarcadores é bastante útil para a pesquisa, na medida em que contribui para o entendimento dos mecanismos patológicos, para a descoberta de novos fármacos (pois podem ser um indicador da eficácia da nova molécula) e contribui na redução dos custos, no avanço do diagnóstico, tratamento e manejo de transtornos psiquiátricos como a esquizofrenia (Schawarz; Bahn, 2008). Biomarcadores também podem ser úteis na determinação de alvos farmacológicos bem como na seleção de moléculas que interajam com

esses alvos para o desenvolvimento de novos fármacos (Frank; Hargreaves, 2003).

Alguns aspectos analíticos devem ser considerados na determinação de biomarcadores em matrizes biológicas, tais como: alguns ensaios são afetados por lesão ao tecido ou estresse celular ocorrido durante a coleta da amostra; o armazenamento da amostra em baixas temperaturas é uma etapa chave e deve acontecer o mais rápido possível; a escolha da matriz é um componente crítico para o sucesso do ensaio com o biomarcador; macromoléculas se apresentam em diversas isoformas *in vivo*, o que adiciona complexidade à quantificação; fatores extrínsecos, tais como estado emocional, dieta, ciclo hormonal e estações do ano podem contribuir para a variação da concentração/ atividade de biomarcadores durante um estudo clínico (Bakhtiar, 2008).

Na esquizofrenia, os biomarcadores neuropsicológicos, como déficits na atenção, habilidade motora e memória de curta duração observados em crianças de 7 a 12 anos como preditores de desenvolvimento desse transtorno podem ser citados. Outros biomarcadores de destaque são aqueles obtidos por neuroimagem; um exemplo é o alargamento do 3º ventrículo nos pacientes com esquizofrenia (Pantelis et al., 2009).

Nesse projeto, foram investigadas a atividade de subtipos de PLA₂ (iPLA₂, cPLA₂ e sPLA₂) e os níveis de GSK-3B total e fosforilada em plaquetas de pacientes com esquizofrenia como possíveis biomarcadores periféricos. As plaquetas podem ser consideradas um modelo periférico do neurônio porque compartilham características comuns, como alterações dos

níveis da PLA₂, da fluidez de membrana, dos níveis de proteína quinase C (PKC) e hiperatividade de receptores serotoninérgicos em pacientes com depressão (Owens; Nemeroff, 1994; Padovani et al., 2001). Além disso, as plaquetas armazenam e liberam neurotransmissores, e esta liberação é controlada pelo cálcio intracelular; plaquetas expressam várias proteínas relacionadas a neurônios como os receptores N-metil D-aspartato (NMDA) e, ainda, as plaquetas prolongam o processamento da membrana plasmática, lembrando neuritos que são esculpidos pelas proteases extracelulares (Bush; Tanzi, 1998). Estudos indicaram que as plaquetas são uma matriz biológica adequada para o estudo periférico de neurônios predominantemente gabaérgicos (Kaneez; Saeed, 2009), serotoninérgicos (de Prada et al., 1988) e de aminas biogênicas, incluindo a dopamina (Stahl, 1977). Talib (2006) verificou que a plaqueta é uma matriz biológica apropriada para determinação de subtipos de PLA₂ em transtornos neuropsiquiátricos, pois foi observado que as plaquetas expressam pelo menos uma enzima de cada grupo enzimático (iPLA₂, cPLA₂, sPLA₂), sendo a PLA₂ em plaquetas um biomarcador periférico que reflete as condições do SNC.

Plaquetas e neurônios também compartilham similaridades no conteúdo lipídico, embora o fosfolípide cerebrosídeo, principal constituinte da bainha de mielina, não seja encontrado nas plaquetas (Marcus et al., 1969). Outras diferenças que podem ser citadas são a mobilidade e a constante renovação das plaquetas, enquanto os neurônios se dispõem em redes densas e a taxa de renovação é muito baixa.

Prevê-se que a nova geração de biomarcadores aproveitará as tecnologias emergentes, como a farmacogenética, genótipos de moléculas transportadoras e metabolizadores de fármacos, perfil de expressão de ácido ribonucleico (RNA), e irão focar na doença bem como em mecanismos de ação para potencializar o tratamento (Frank; Hargreaves, 2003). Especificamente para a esquizofrenia, acredita-se que essa nova geração de biomarcadores irá modificar alvos envolvidos em processos neuronais que estabilizam processos cognitivos no córtex pré-frontal (Mikkelsen et al., 2010).

2.6.1 Fosfolipases A₂

2.6.1.1 Características

As fosfolipases A₂ são as principais enzimas envolvidas no metabolismo de PUFA das membranas neuronais. No metabolismo dos PUFA, conhecido com ciclo de deacilação-reacilação, a PLA₂ atua removendo o ácido graxo essencial (AGE) ligado na posição *sn*-2 do fosfolípide, liberando o ácido graxo livre e o lisofosfolípide, ambas moléculas altamente ativas na sinalização celular (Sung; Horrocks, 1970; Farooqui et al., 2000a; 2000b). Esse processo proporciona uma oportunidade para a célula alocar na posição *sn*-2 vaga um ácido graxo mais apropriado para uma determinada função (Bazan et al., 1993).

No organismo saudável, as PLA₂ são as principais responsáveis pelo fornecimento de ácido araquidônico (AA), precursor de uma série de moléculas sinalizadoras, conhecidas por eicosanoides, as quais incluem prostaglandinas, leucotrienos e hidroxiácidos. Essas moléculas atuam como segundos mensageiros e a ativação da PLA₂ desencadeia diversas cascatas de sinalização intracelulares, como ativação dos receptores dopaminérgicos D₂ (Vial; Pionelli, 1995), serotoninérgicos 5HT₂ (Berg, 1996), muscarínicos M₁ (Jones et al., 1996) e glutamatérgicos (Farooqui; Horrocks, 1994). A etapa chave na deacilação em células é a hidrólise do AA da posição *sn*-2 dos fosfolípidos catalisada pela PLA₂. No entanto, é importante acrescentar que há outras enzimas que também podem gerar o AA, como as fosfolipases C e D e, também, este pode ter seus níveis aumentados quando sua utilização no ciclo de reacilação de lisofosfolípidos é inibida (Balsinde; Balboa, 1999).

No SNC a inflamação é diferente da observada nos demais tecidos. A estimulação de receptores NMDA de glutamato ativa a PLA₂ e liberação de AA, provocando aumento da síntese de eicosanoides e fator de ativação de plaquetas (PAF) e indução da ciclooxigenases (COX) do tipo 2 em neurônios. As prostaglandinas, derivadas do AA pela ação da COX, estão envolvidas na regulação da condução nervosa e na liberação de neurotransmissores (Piomelli, 1993). Os eicosanoides, por serem anfipáticos (possuírem uma parte polar e outra apolar), podem cruzar a membrana neuronal e atuar em células vizinhas. Uma vez que prostaglandinas, leucotrienos e PAF podem ser derivados da ação da PLA₂,

a inibição dessa enzima interfere simultaneamente na síntese dessas três diferentes classes de sinalizadores.

2.6.1.2 Subtipos de PLA₂ e inibidores

2.6.1.2.1 PLA₂ intracelular independente de cálcio (iPLA₂)

O grupo das iPLA₂ é formado por isoformas com alto peso molecular (~85 kDa), com ação hidrolítica independente de íons cálcio, com diferentes mecanismos de regulação e maior especificidade para o ácido palmítico ligado à posição *sn*-2 do fosfolípide (Burke; Dennis, 2009). O grupo PLA₂ GVI é subdividido em GVIA, GVIB, GVIC, GVID, GVIE e GVIF e está envolvido no remodelamento de fosfolípides através de um ciclo de acetilação/ reacilação da membrana de fosfolípides chamado ciclo *Lands* (revisão em Balsinde; Dennis, 1996). A atividade catalítica da iPLA₂ é regulada por quantidade de cálcio em estoques intracelulares ou pela proteína calmodulina dependente de cálcio, apesar da atividade de iPLA₂ não depender do cálcio (Dennis; Burke, 2009).

As funções da PLA₂ GVIA incluem remodelamento de fosfolípides (Balsinde et al., 1995); aumento da liberação de AA (Rickard et al., 2005); relaxamento da vasculatura endotelial mediada por acetilcolina (Seegers et al., 2002); secreção (Song et al., 2006; Balboa et al., 2003); apoptose (Perez et al., 2006); *clearance* de células apoptóticas mediado por macrófagos (Perez et al., 2006) e proliferação de linfócitos (Roshak et al.,

2000). Foi demonstrado que a atividade da iPLA₂ varia no decorrer do ciclo celular (Manguikian; Barbour, 2004).

2.6.1.2.2 PLA₂ citosólica dependente de cálcio (cPLA₂)

As cPLA₂, também denominadas Grupo IV, são enzimas intracelulares, citosólicas, como alto peso molecular (85 kDa), necessitam de íons cálcio em concentrações micromolares e apresentam alta afinidade pelo AA como ácido graxo na posição *sn*-2 do fosfolípide (Dennis, 1994; Akiba; Sato, 2004). As cPLA₂ (isoforma GIVA) são encontradas em diversas células, como linfócitos, plaquetas, queratinócitos, células endoteliais, musculares, epiteliais alveolares (Kramer; Sharp, 1997).

A PLA₂ GIVA está envolvida no mecanismo de estresse oxidativo e distúrbio sináptico envolvidos na patogênese de transtornos psiquiátricos, especialmente na doença de Alzheimer (Shelat et al., 2008). Em neurônios corticais em cultura, o peptídeo β -amiloide induziu a formação de ROS via ativação de receptores NMDA. As ROS levaram à ativação de PLA₂ GIVA, o que ocasionou aumento de AA e lisofosfolípides. O AA pode atuar como um sinalizador retrógrado e exercer um papel na modulação da plasticidade sináptica; lisofosfolípides podem causar perturbação na membrana plasmática. Os antagonistas de receptores NMDA, como por exemplo a memantina, podem bloquear o aumento do AA por essa via, demonstrando um efeito neuroprotetor. Em outro estudo em cultura celular, Mashimo et al. (2008) observaram que a estimulação de receptores α -amino-3 hidróxi-5-

metilizoxazole-4-propionato (AMPA) levou à translocação da PLA₂ GIVA para os compartimentos de Golgi somáticos e dendríticos e o uso de inibidores da PLA₂ GIVA reduziu o número de subunidades GluR₂ de receptores de glutamato, em neurônios de Purkinje. Esses resultados demonstraram o envolvimento da cPLA₂ na *long-time potentiation* (LTP) cerebelar através do decréscimo persistente da expressão de receptores AMPA, uma forma de plasticidade sináptica (Mashimo et al., 2008).

2.6.1.2.3 PLA₂ extracelular dependente de cálcio (sPLA₂)

Esse subtipo se caracteriza por baixo peso molecular (~ 16 kDa) (exceto sPLA₂ GIII), pela presença de um peptídeo N-terminal sinalizador, necessidade de íons cálcio na ordem de milimolar para a hidrólise, por não apresentar maior afinidade pelo AA em relação a outros ácidos graxos ligados em *sn*-2, por ser estocado em grânulos citoplasmáticos e ser secretado para o meio extracelular mediante estimulação (Dennis, 1994; Lambeau; Gelb, 2008). As formas secretórias de PLA₂ são subdivididas nos grupos GI, GII, GIII, GV, GIX, GX, GXI, GXII, GXIII, GXIV (Schaloske; Dennis, 2006).

As sPLA₂ apresentam mecanismo de ação simples e bem definido. Não é uma enzima acil clássica, com características de serina-protease. Assim, o mecanismo de ação envolve a tríade catalítica, contendo resíduos de histidina (His) e de ácido aspártico (Asp), juntamente com o íon cálcio, o qual se liga ao sítio denominado *loop* pancreático para polarizar uma

ligação com a molécula de água e então atacar um radical carbonila presente nos fosfolípidos. Agem de maneira ótima quando o substrato fosfolipídico é parte de uma interface como uma micela ou membrana (Dennis, 1994).

Nos mamíferos, isoformas da sPLA₂ estão presentes no suco pancreático e participam da digestão; participam de respostas celulares em vários tecidos via receptores do tipo muscarínico; e estão aumentadas nos processos inflamatórios (Pfeilschifter et al., 1993; Ishizaki et al., 1994; Kuwata et al., 1998).

A expressão elevada de alguns subtipos de PLA₂ secretórias em várias doenças inflamatórias sugere que estas estão envolvidas nos mecanismos de defesa (Dennis, 1994). As sPLA₂ estão envolvidas na transdução de sinais e suas atividades estão alteradas em algumas doenças neurodegenerativas fortemente associadas com inflamação e estresse oxidativo, injúria no tecido neural e em alguns tumores cerebrais (Yang et al., 1999). Além disso, as sPLA₂ estão presentes em todas as regiões cerebrais e apresentam maior atividade na medula oblongata, hipocampo e córtex e menor atividade no tálamo e hipotálamo (Farooqui et al., 2004).

2.6.1.2.4 Outros subtipos de PLA₂

Schaloske e Dennis (2006) descreveram dois grupos de serina-PLA₂ GVII e GVIII que hidrolisam grupos acetil da posição *sn*-2 de PAF e foram então nomeadas PAF-acetilhidrolases (PAF-AH).

Abe e Shayman (1998) purificaram a PLA₂ GXV lisossomal em tecido cerebral bovino. Essa enzima possui ação de esterificação de um grupo acil com um grupo hidroxil na posição C1 de ceramidas, na qual os fosfolípides atuam como grupo doador.

Duncan et al. (2008) encontraram um transcrito que codifica uma proteína de 18 kDa ativamente expressa em tecido adiposo, a qual foi classificada como PLA₂ tecido adiposo-específica. Foi proposto que essa enzima possa ser a primeira de um novo subtipo de PLA₂ independente de cálcio, constituindo o grupo XVI.

2.6.1.2.5 Inibidores de PLA₂

A estimulação das isoformas de PLA₂, aumento do AA e geração de PAF são importantes eventos na inflamação e estresse oxidativo associado a trauma neural agudo e transtornos neurológicos crônicos (Farooqui; Horrocks, 1994; Phillis; O'Regan, 2004). O uso de inibidores potentes e seletivos da atividade da PLA₂ como agentes terapêuticos representa uma alternativa no tratamento destes transtornos. Além disso, a existência de

diferentes tipos de PLA₂ atuando em conjunto dificulta a análise de cada uma isoladamente.

A bromoenol-lactone (BEL) é um potente inibidor de iPLA₂ de cérebro bovino e PLA₂ plasmalogênio-seletiva (PAF-AH) com valores de concentração inibitória mínima (CI₅₀) de 60 e 40 nM, respectivamente (Farooqui et al., 2006).

Fosfonato análogo do ácido araquidônico, a atividade inibitória irreversível do metil araquidonil fluorofosfonato (MAFP) ocorre pela reação com o resíduo de serina no sítio ativo da enzima, resíduo comum catalítico à cPLA₂ (CI₅₀ = 0,5 µM) e iPLA₂ (CI₅₀ = 0,75 µM) (Farooqui et al., 2006).

Análogo do AA em que o grupo carboxila é substituído por um grupo trifluorometilcetona, a araquidonil trifluorometil cetona (AACOCF₃) inibe cPLA₂ e iPLA₂ de cérebro bovino de maneira dose-dependente com valores de CI₅₀ de 1,5 e 6,0 µM, respectivamente (Farooqui et al., 2006).

Outro componente de forma estrutural semelhante ao AACOCF₃ é o palmitoil trifluorometil cetona que demonstra ser quatro vezes mais potente que AACOCF₃ (CI₅₀ = 3,8 µM) para a hidrólise de dipalmitoil glicerofosfocolina pela iPLA₂ (Ackerman; Dennis, 1995).

2.6.1.3 Metabolismo de lípides bioativos

Todas as membranas neuronais, tanto internas quanto externas, são amplamente constituídas de fosfolípides (Horrobin et al., 1994). O padrão de organização de fosfolípides na bicamada da membrana neuronal é

determinado pelo tamanho e orientação das cabeças polares e cadeias acil/alquil.

Fosfolípidos constituem a base estrutural das membranas e também confere a estas as características de fluidez, permeabilidade para íons e, ainda, permitem a criação de um delicado microambiente no interior celular. Na bicamada fosfolipídica de membranas neuronais estão inseridos receptores, enzimas e canais iônicos em vários níveis que se projetam da membrana ou são localizados predominantemente na superfície intra ou extracelular; as membranas são altamente interativas e dinâmicas. A interação de um agonista com um receptor leva ao aumento do metabolismo fosfolipídico que, conseqüentemente, regula a atividade das enzimas, receptores e canais iônicos ligados à membrana (Farooqui; Horrocks, 2004).

Fosfolípidos são particularmente importantes na sinalização celular, na formação e remodelamento de dendritos e sinapses (Horrobin et al., 1994; Horrobin 1998a; 1998b). Todos os neurotransmissores são transportados em vesículas fosfolipídicas. O aumento e a reposição de alguns desses neurotransmissores e íons dependem do realinhamento das moléculas fosfolipídicas. A natureza do fosfolípide é um fator determinante na maneira pela qual o transmissor ou íon será liberado ou recapturado (Horrobin; Bennett, 1999).

Membranas neuronais contêm as três maiores categorias de lípidos: colesterol, esfingolípides e fosfolípidos. Um fosfolípide típico é constituído de três regiões: uma cabeça polar, hidrofílica, glicerol, e uma cadeia longa de hidrocarbonetos, hidrofóbica. Os fosfolípidos do tecido cerebral são ricos

em PUFA com três a seis duplas ligações. Esses ácidos graxos são importantes para permitir rápidas mudanças no formato da membrana e sua fusão durante a formação e rompimento das conexões sinápticas, juntamente com o aumento de neurotransmissores (Horrobin; Manku, 1990; Horrobin, 1992).

2.6.1.4 PLA₂ e esquizofrenia

Em grande parte dos casos, os PUFA podem estar envolvidos na etiologia da esquizofrenia. Nesses casos, os ácidos graxos das séries ômega 3 e 6 estão diminuídos e são observadas anormalidades no metabolismo de fosfolípides. A hipótese da composição da membrana postula que a mudança nesses fosfolípides resulte diretamente em alterações nos níveis dos ácidos graxos, o que afeta diversas funções cerebrais, tais como a interação entre neurotransmissor e receptor. Estudos com animais indicaram que a manipulação dietética dos ácidos graxos que compõem a membrana ocasionou um aumento da densidade de receptores D₂ no núcleo *accumbens* e diminuição da densidade desses receptores no córtex frontal (revisado em du Bois et al., 2005).

Gattaz e Brunner (1996) demonstraram que a injeção intracerebral de PLA₂ em dois modelos animais provocou uma inibição da atividade dopaminérgica no córtex frontal, de acordo com a hipótese da hipofrontalidade da esquizofrenia.

Em estudo envolvendo pacientes virgens de tratamento, pacientes crônicos sem tratamento medicamentoso há pelo menos 6 meses e sujeitos controles, Yacubian et al. (2002) observaram uma redução de fosfodiésteres nos pacientes virgens de tratamento quando comparados aos controles e aos pacientes medicados anteriormente. Não foram observadas diferenças nos fosfomonoésteres entre os grupos. A técnica utilizada foi a espectroscopia de ressonância magnética do fósforo – 31 (^{31}P – MRS). Foi também observada uma relação entre os níveis de adenosina trifosfato, sintomas negativos e déficits neuropsicológicos, sugerindo uma alteração da demanda energética no córtex frontal de pacientes com esquizofrenia, o que está em concordância com a hipótese da hipofrontalidade.

Há também a hipótese da membrana fosfolipídica, que se baseia nas seguintes evidências (revisado por Horrobin, 1998a; 1998b): há um aumento da atividade de PLA_2 em células sanguíneas na esquizofrenia; há uma redução de AA e de ácido docosa-hexanoico (DHA) nas membranas dos eritrócitos na esquizofrenia; pacientes com esquizofrenia são menos responsivos ao teste da niacina, indicando que a quantidade de AA disponível está reduzida (Tavares Jr et al., 2003). Junqueira et al. (2004) observaram uma associação entre um polimorfismo gênico de iPLA_2 e esquizofrenia, sugerindo que este subtipo pode ter alguma função no desencadeamento desse transtorno. Esses achados reforçam a pertinência do estudo das PLA_2 , determinando sua atividade por subtipos principais, a fim de contribuir com o esclarecimento do papel exercido por cada subtipo enzimático na esquizofrenia.

2.6.1.4.1 Estudos em tecido cerebral

Gattaz et al. (1995) observaram um aumento da atividade de PLA₂ em tecido cerebral de pacientes com esquizofrenia. Em outro estudo, Horrobin et al. (1991) também observaram um aumento da atividade de PLA₂ no lobo frontal de pacientes com esquizofrenia. Estudos de ³¹P – MRS no lobo frontal de pacientes com esquizofrenia encontram uma diminuição de fosfomoésteres e aumento de fosfodiésteres, precursores e metabólitos dos fosfolípides em tecido cerebral, respectivamente (Williamson et al., 1991; Pettegrew et al., 1993). No entanto, esses estudos de ³¹P – MRS são ainda controversos, pois em outro estudo, com pacientes livres de antipsicóticos (Yacubian et al., 2002), não foram encontradas diferenças nos níveis de fosfomonoésteres nos grupos de pacientes.

Schmitt et al. (2004) determinaram a composição lipídica do tálamo esquerdo de 18 pacientes com esquizofrenia crônica e 23 sujeitos controles. Foi observado que a fosfatidilcolina (principal componente da membrana celular) e que a esfingomielina, e galactocerebrosídeos 1 e 2 (principais componentes da bainha de mielina) estavam diminuídos no tecido cerebral dos pacientes, enquanto que a fosfatidilserina estava aumentada. Esses resultados reforçam os achados sobre o aumento da hidrólise dos fosfolípides na esquizofrenia.

2.6.1.4.2 Estudos em matrizes periféricas

Aumentos na atividade de PLA₂ total foram reportados no plasma (Gattaz et al., 1987), soro (Schulze et al., 1988; Gattaz et al., 1990) e plaquetas (Gattaz et al., 1995) de pacientes com esquizofrenia.

Além disso, conforme revisado em Rotrosen e Wolkin (1987), foi encontrada uma diminuição da concentração de fosfolípides nos eritrócitos de pacientes com esquizofrenia e um aumento da concentração do metabólito lisofosfatidilcolina na membrana de plaquetas (Pargerl et al., 1991). Foi ainda observado que a concentração de AA em eritrócitos estava reduzida em um subgrupo de pacientes com esquizofrenia (Glen et al., 1994; Peet et al., 1994).

A aceleração do metabolismo de fosfolípides tem sido atribuída principalmente ao aumento da atividade da cPLA₂, a qual seletivamente cliva o AA de vesículas de membranas naturais (Clark et al., 1991). Isso está de acordo com achados de que níveis de AA e DHA estão significativamente diminuídos em pacientes com esquizofrenia (Peet; Mellor, 1998) e com relatos clínicos de uma significativa redução nos sintomas positivos depois da suplementação com AGE (Peet, 1999).

Um aumento da atividade de PLA₂ já foi discutido em outros transtornos psiquiátricos nos quais possam ocorrer sintomas psicóticos, como na epilepsia do lobo temporal e na esclerose múltipla (Simonato, 1993; Visioli et al., 1994). Recentemente, Gattaz et al. (2011) observaram aumento da atividade do subtipo cPLA₂ em tecido cerebral de pacientes

com epilepsia do lobo temporal que apresentavam sintomas psicóticos quando comparados a pacientes com o mesmo transtorno sem a presença dos sintomas psicóticos, o que reforça o estudo dessa enzima na esquizofrenia, que é caracterizada por sintomas psicóticos.

2.6.1.4.3 PLA₂ e antipsicóticos

Gattaz et al. (1987) observaram que o uso de neurolépticos durante três semanas reduziu a atividade da PLA₂ total em soro de pacientes com esquizofrenia para valores próximos aos obtidos no grupo controle.

Em plaquetas, Gattaz et al. (1995) observaram que a administração de haloperidol 10 mg/ dia reduziu a atividade da PLA₂ total em 15 % após a 1ª semana de tratamento (quando comparada ao *baseline*) e depois esta permaneceu constante até a 3ª semana de tratamento. Essa redução na atividade da PLA₂ não se correlacionou com a melhora na psicopatologia.

Schmitt et al. (2001) determinaram a concentração de fosfolípides na membrana plaquetária em 67 pacientes com esquizofrenia livres de tratamento medicamentoso. Foi observado que nas primeiras três semanas com tratamento com antipsicóticos ocorreu uma diminuição da lisofosfatidilcolina atingindo valores iguais aos do grupo controle. No entanto, ao final de seis meses os níveis da lisofosfatidilcolina estavam aumentados quando comparados aos observados no grupo controle. Esses resultados sugerem uma hiperatividade da PLA₂ no período agudo do

transtorno, que é influenciada pelo tratamento com antipsicótico somente no início, sem uma ação persistente deste.

2.6.1.5 PLA₂ e outros transtornos psiquiátricos

Depressão

Nakamura (1994) relatou que a PLA₂ está envolvida no mecanismo de regeneração dos axônios noradrenérgicos cerebrais induzido por antidepressivos e que inibidores da PLA₂ podem prejudicar a regeneração induzida pelo antidepressivo desipramina em axônios noradrenérgicos.

Transtorno afetivo bipolar

A relação entre a anormalidade do metabolismo de fosfolípides e o transtorno afetivo bipolar foi postulada por Hibbeln et al. (1999). Estudos sugerem que anormalidade do crescimento (Geddis et al., 2004) e sinalização neuronal (Sun et al., 2004) são possíveis fatores etiológicos. Estudos de ³¹P – MRS demonstram níveis alterados de fosfomoésteres e fosfodiésteres envolvidos na síntese e catabolismo de fosfolípides em cérebros de pacientes com TAB e sugerem o aumento da atividade de PLA₂ como mecanismo candidato para o aumento de fosfodiésteres no TAB (Deicken et al., 1995).

Epilepsia

Foi descrito que as crises epilépticas promovem uma superativação da PLA₂ que resulta no acúmulo de lípides bioativos nas sinapses (Bazan, 1998). Uma estimulação prolongada da PLA₂ pode danificar a integridade da membrana não somente pelo aumento excessivo de cálcio intracelular que levaria à lipólise, proteólise excessiva e a fragmentação de DNA, mas também pela perda de fosfolípides essenciais para a formação da dupla camada lipídica, devido à característica detergente de PAF, produto da hidrólise do AA (Farooqui et al., 1996; Feuerstei, 1996; Bazan et al., 2002).

Doença de Alzheimer

A diminuição da atividade da PLA₂ resulta em redução do metabolismo dos fosfomoésteres, seus substratos naturais. A diminuição da transformação da fosfatidilcolina em AA e lisofosfatidilcolina em neurônios colinérgicos compromete a formação da colina, substrato de síntese da acetilcolina, contribuindo para um déficit colinérgico (Blusztajn et al., 1987; Schaeffer, 2004). Níveis reduzidos de PLA₂ foram encontrados em amostras de tecido cerebral e plaquetas de pacientes com doença de Alzheimer, afetando de forma negativa o metabolismo fosfolipídico da membrana celular e, conseqüentemente, alterando o funcionamento cerebral (Gattaz et al., 1996).

2.6.2 Glicogênio sintase quinase- 3 beta

2.6.2.1 Características

A GSK-3 é uma enzima ubíqua, bastante conservada durante a evolução, encontrada em duas isoformas em mamíferos, a GSK-3A e a GSK-3B. Estas apresentam pesos moleculares diferentes, GSK-3A, 52 kDa e GSK-3B, 47 kDa, são codificadas por genes diferentes, porém possuem controles da atividade enzimática semelhantes. A fosforilação do resíduo de serina na posição 21 inativa a GSK-3A, enquanto que a fosforilação de Ser9 inativa a GSK-3B (Kozlovsky et al., 2002; Nadri et al., 2002).

Devido ao envolvimento da GSK-3 em diversas vias de sinalização celular, atualmente pesquisas a respeito da sua regulação em diversas áreas (psiquiatria, metabolismo energético, neoplasias e processos inflamatórios) estão sendo conduzidas.

Em relação à psiquiatria, esta proteína está presente em cascatas de transdução de sinais em vários processos celulares; dentre estes, os relacionados ao neurodesenvolvimento são os mais significativos (Kozlovsky et al., 2000; Lovestone et al., 2007).

Sabe-se que a disfunção da GSK-3B no cérebro adulto pode causar sintomas psicóticos e déficits cognitivos, ocasionando modificações de determinados eventos da sinalização dopaminérgica (Lovestone et al., 2007). Além disso, a GSK-3B possui um papel crucial no cérebro maduro em relação à plasticidade, sinaptogênese e LTP, habilidades de

aprendizado, memória, transporte axonal e crescimento. Consequentemente, qualquer alteração desta enzima pode ser bastante deletéria (O'Brien et al., 2004; Lovestone et al., 2007). A via *Wnt* é uma cascata bioquímica na qual a GSK-3B está envolvida em diversos processos de sinalização celular (Hur; Zhou, 2010).

2.6.2.2 A via de sinalização *Wnt*

Os genes *Wnt* codificam uma família de glicoproteínas secretoras, as quais possuem um papel central na sinalização molecular intracelular, tanto durante o desenvolvimento dos neurônios quanto no SNC maduro. Desta maneira, tais proteínas participam de diversos processos, incluindo padronização de células embrionárias e regulação da proliferação de células, polarização e determinação de processos de sobrevivência (Wodarz; Nusse, 1998; Lovestone et al., 2007). Este papel é fundamental para o crescimento e manutenção de neurônios dopaminérgicos (Castelo-Branco et al., 2003; Ciani; Salinas, 2005; Lovestone et al., 2007). Sabe-se que, por meio de processos autócrinos e parácrinos, a via *Wnt* induz células a proliferarem, diferenciarem e sobreviverem e, ainda, que mudanças no citoesqueleto de axônios em desenvolvimento são fortemente induzidas por proteínas da família *Wnt* (Kozlovsky et al., 2002). Assim, essa cascata de sinalização pode estar envolvida na causa de alguns defeitos citoarquiteturais analisados na esquizofrenia (Beasley et al., 2001) e a sua

importância na regulação da padronização durante o desenvolvimento cortical foi documentada (Grove et al., 1998).

Embora não seja completamente conhecida como ocorra a sinalização da via *Wnt*, é possível que essas proteínas promovam interações com a família *frizzled* de receptores, levando à ativação das proteínas *dishevelled* (Dvl) (Noordermeer et al., 1994; Bhanot et al., 1996). Após tal processo, a Dvl inativa um complexo proteico, que contém GSK-3B. Tal fato, em contrapartida, leva à estabilização, acumulação e translocação nuclear de β -catenina (van Leeuwen et al., 1994; Polakis, 1997; Brown; Moon, 1998; Ikeda et al., 1998). Um complexo nuclear que consiste de *T-cell factor/lymphoid enhancer factor* (TCF/LEF) interage com a β -catenina e esta interação modifica a transcrição de genes contendo um ou mais elementos promotores do TCF (Huber et al., 1996). No estado inativo, o complexo GSK-3/ axina/ APC se liga e fosforila a β -catenina levando esta estrutura à destruição (Ikeda et al., 1998).

A diferenciação sináptica e a arborização terminal de axônios são reguladas por sinais retrógrados, os quais são proteínas secretórias da família *Wnt*. Uma diminuição na extensão do axônio combinada com um aumento cônico em seu tamanho leva a esta diferença morfológica, produzindo mudanças significativas nos microtúbulos. Tais mudanças dinâmicas estão fortemente relacionadas com a GSK-3B, pois proteínas *Wnt* sinalizam por meio desta molécula. Consistente com suas funções no tecido cerebral, a cascata *Wnt* é essencial para o remodelamento correto dos terminais pré-sinápticos nesse órgão (Salinas, 2005). Paralelamente a

isso, esta é uma cascata crucial para a formação e organização de neurônios do mesencéfalo (Castelo-Branco et al., 2003). Além disso, a via *Wnt* é certamente vital para a regionalização do cérebro dos mamíferos e fosforilação da proteína Tau, que é associada a microtúbulos (Schaffer et al., 2003), além da padronização cortical e adesão celular (Fuentealba et al., 2004; Toro; Deakin, 2007).

2.6.2.3 GSK-3B e esquizofrenia

2.6.2.3.1 Estudos em tecido cerebral

Kozlovsky et al. (2000) estudaram o córtex frontal de pacientes com esquizofrenia (n = 14), de pacientes com TAB (n = 15), de pacientes depressivos unipolares (n = 15) e de controles (n = 14). Foram encontrados níveis 41 % menores de GSK-3B no córtex frontal dos pacientes com esquizofrenia quando comparados aos dos controles. Não foram encontradas diferenças entre os demais grupos (Kozlovsky et al., 2000). Em estudo subsequente os autores verificaram que essa redução dos níveis de GSK-3B foi acompanhada de uma atividade enzimática menor (45 % menor que nos controles) nos pacientes com esquizofrenia (Kozlovsky et al., 2001). Foram também verificados os níveis de GSK-3B no córtex occipital e não foram encontradas diferenças entre os grupos. Esses resultados sugerem que reduções no córtex frontal não induzem e nem representam uma alteração geral nos níveis dessa proteína no cérebro (Kozlovsky et al.,

2001). Posteriormente, com tamanho da casuística e tipo de pacientes semelhantes, Kozlovsky et al. (2004b) demonstraram que somente os níveis de RNA mensageiro (mRNA) da GSK-3B estão 36 % menores no córtex pré-frontal dorsolateral (DLPFC) no grupo dos pacientes com esquizofrenia. Ressalta-se que havia três pacientes sem medicação no período de suas mortes e estes não apresentaram diferenças nos níveis de mRNA da GSK-3B quando comparados com os que estavam sendo tratados com antipsicóticos no mesmo período; também não foi observada diferença entre aqueles que estavam sendo tratados com lítio em relação aos demais pacientes. Além disso, os níveis de mRNA não apresentaram associações com o período de tempo no qual os antipsicóticos foram utilizados. Portanto, é possível que os níveis proteicos e expressão gênica de GSK-3B se relacionem com o transtorno e não com o tratamento medicamentoso (Kozlovsky et al., 2004b; Nadri et al., 2004). Provavelmente, uma redução na transcrição do gene da GSK-3B cause essas alterações encontradas nos pacientes com esquizofrenia, porém deve-se considerar que o mRNA da GSK-3B pode ser instável após a transcrição e, conseqüentemente, ser rapidamente degradado. De acordo com Kozlovsky et al. (2004b), um desequilíbrio na razão e na cronologia da programação da morte celular durante o neurodesenvolvimento pode ser uma possível causa da redução dos níveis de GSK-3B.

Outro grupo de pesquisa também encontrou uma redução de 21 % nos níveis de p(Ser9)-GSK-3B e GSK-3B total no grupo de pacientes com esquizofrenia quando comparado ao grupo controle (n=10/ cada) (Beasley

et al., 2001). A estabilidade dos microtúbulos foi devida à fosforilação de proteínas associadas a estes pela GSK-3B, causando uma redução em sua habilidade de se ligar aos mesmos. Soma-se a isso o fato de que esta alteração foi consistente com a redução da densidade dos dendritos observada no córtex pré-frontal na esquizofrenia. Aberrações citoarquiteturais observadas em tal transtorno podem ser causadas por modificações nos níveis de GSK-3B durante o desenvolvimento, e assim, o crescimento do neurônio, que é dependente de microtúbulos, fica prejudicado (Beasley et al., 2001). Em seguida, Beasley et al. (2002) analisaram os níveis de GSK-3B, β -catenina e Dvl-2 no córtex pré-frontal de pacientes com esquizofrenia, TAB, depressão maior e controles (n = 15/grupo), e não encontraram diferenças significativas entre o grupo controle e o grupo de pacientes com esquizofrenia. A não concordância entre esse estudo e o anterior (Beasley et al., 2001) pode ter sido causada por diferenças na metodologia, nas amostras, nos diagnósticos, no recrutamento, dentre outras.

Pacientes com esquizofrenia apresentaram uma redução de 31 % na GSK-3 total no hipocampo, além de redução dos níveis de mRNA da GSK-3A (22 %) e GSK-3B (28 %). No entanto, não foram encontradas diferenças significativas no córtex frontal. Considerando-se a citoarquitetura molecular do hipocampo, é razoável predizer que esta pode se relacionar com a patologia da esquizofrenia (Nadri et al., 2004).

Em outro estudo foi observada uma redução de 40 % nos níveis de mRNA da GSK-3B no DLPFC de pacientes com esquizofrenia e uma

redução de 41 % nos níveis da GSK-3B no córtex frontal, acompanhada de uma diminuição na atividade em 45 %. Foram também avaliados pacientes com TAB e depressão unipolar. Os níveis reduzidos de GSK-3B são considerados uma consequência tardia do insulto perinatal no neurodesenvolvimento na esquizofrenia (Kozlovsky et al., 2005). Ressalta-se que estes níveis diminuídos de GSK-3B no grupo dos pacientes com esquizofrenia não foram causados por deterioração *post mortem* e que, ao contrário do que se esperava, nenhuma correlação entre os níveis de GSK-3B e a atividade dessa enzima foi confirmada (Kozlovsky et al., 2005).

Estudos envolvendo associação de polimorfismos de base única (SNP) de GSK-3B com esquizofrenia devem ser citados. Benedetti et al. (2010) mostraram, pela 1ª vez, uma redução do volume de massa cinzenta em pacientes portadores do genótipo timina/ timina (quando comparados aos pacientes que possuem pelo menos um alelo citosina) do polimorfismo rs334558, que influencia a atividade de GSK-3B. Em estudo conduzido no Brasil (Souza et al., 2008), não foi encontrada associação de SNPs de GSK-3B com resposta a clozapina, apesar de três SNPs (rs7624540, rs 4072520 e rs6779828) estarem associados com a esquizofrenia, na comparação caso-controle.

2.6.2.3.2 Estudos em matrizes biológicas periféricas

Os níveis de GSK-3B foram analisados em linfócitos de pacientes com esquizofrenia (n = 48) (Yang et al., 1995; Kozlovsky et al., 2002). Foi

observada uma redução nos níveis dessa proteína e esta foi acompanhada de uma redução de cerca de 20 % da atividade enzimática quando comparados ao grupo controle (Kozlovsky et al., 2002).

No entanto, Nadri et al. (2002) avaliaram os níveis da GSK-3B em linfócitos de 18 pacientes, e em 9 deles a atividade da GSK-3B também foi avaliada; a expressão gênica foi avaliada em 10 pacientes. Não foram encontradas diferença entre os níveis, atividade ou expressão gênica da GSK-3B quando comparados com o grupo controle. Além disso, alguns pacientes possuíam níveis elevados de GSK-3B. Sendo assim, foi demonstrada a necessidade de maior número de pacientes para essas avaliações em linfócitos. Outra possibilidade é de não haver a diferença, ou de o linfócito não ser a melhor matriz para essa determinação, devido a influências externas que pode sofrer.

Kozlovsky et al. (2004a) reportaram uma redução significativa dos níveis de GSK-3B no líquido de 6 pacientes com esquizofrenia comparados com o grupo controle (n = 17). O líquido é a matriz biológica mais adequada para refletir as modificações observadas no tecido cerebral dos pacientes. Foi observado que os níveis de GSK-3B estavam 29 % menores nos pacientes com esquizofrenia. Esse achado reforça a hipótese de que níveis reduzidos de GSK-3B podem ser um dos fatores etiológicos da esquizofrenia, e o líquido pode fornecer informações relacionadas tanto com a origem quanto com o progresso do transtorno (Kozlovsky et al., 2004a). Devido à sua proximidade com o cérebro, o líquido, um fluido biológico obtido por punção lombar, provavelmente reflete as alterações patológicas desse

órgão e intuitivamente é a matriz de escolha para o estudo de biomarcadores em transtornos psiquiátricos. No entanto, sua baixa concentração de proteínas (0,18 – 0,58 mg/ mL) é uma limitação para sua utilização em várias técnicas analíticas (Schwarz; Bahn, 2008). Essa limitação se justifica pela concentração mínima de proteínas da matriz biológica necessária para as técnicas analíticas empregadas, além da dificuldade em se obter a amostra.

2.6.2.3.3 GSK-3B e antipsicóticos

Há evidências de que o tratamento agudo com antipsicóticos de 1ª ou de 2ª geração inibe a atividade de GSK-3B, enquanto que o tratamento crônico aumenta sua atividade e, ainda, que o uso de substâncias psicomiméticas inibe a atividade da GSK-3B (Lovestone et al., 2007). A clozapina administrada cronicamente aumenta os níveis totais de GSK-3B, assim como a p(Ser9)-GSK-3B foi consideravelmente reduzida após a administração crônica de haloperidol, resultando em um aumento da atividade da GSK-3B por diferentes mecanismos compensatórios, em roedores (Lovestone et al., 2007).

O córtex pré-frontal é bastante afetado pelos antipsicóticos. Esta região, que recebe *inputs* dopaminérgicos da região mesolímbica, apresentou uma *up-regulation* da GSK-3B após a administração subcrônica de haloperidol e risperidona, e esse efeito foi também observado no corpo estriado, em estudo conduzido em ratos (Alimohamad et al., 2005a). O

tratamento agudo não alterou os níveis dessa proteína, enquanto que a administração crônica induziu um padrão idêntico ao observado no tratamento subcrônico. Foi observado que não só o tratamento contínuo é necessário para provocar mudanças na GSK-3B, mas também que estas alterações não são consequências de fatores extrínsecos como sedação ou outros métodos de administração das drogas. Além disso, de acordo com Alimohamad et al. (2005b), foi verificado que somente os antipsicóticos de 2ª geração foram capazes de alterar a GSK-3B no núcleo *accumbens*. Tal fato pode representar uma distinção significativa entre as classes de antipsicóticos.

Kozlovsky et al. (2006) observaram que a administração *in vivo* de clozapina aumentou os níveis de p(Ser9)-GSK-3B no córtex frontal de roedores, diminuindo a atividade da GSK-3B.

A regulação desta proteína ainda é controversa. Lovestone et al. (2007) atestaram que os antipsicóticos, lítio e drogas psicomiméticas afetam a regulação da GSK-3B. Por outro lado, foi demonstrado por Kozlovsky et al. (2003) que a atividade da GSK-3B no córtex pré-frontal de pacientes com esquizofrenia não se relacionava com o tratamento com antipsicóticos. Uma vez que esses fármacos provavelmente medeiam os receptores de dopamina D₂ e tanto a GSK-3B quanto a β -catenina apresentam uma relação bem próxima com o sistema dopaminérgico, os antipsicóticos promovem mudanças comportamentais por meio de alterações das proteínas supracitadas (Alimohamad et al., 2005a; 2005b). Em camundongos, alterações na regulação da GSK-3B podem produzir

anormalidades no cérebro, as quais são semelhantes às observadas na esquizofrenia (Lovestone et al., 2007).

2.6.2.4 GSK-3B e outros transtornos psiquiátricos

A GSK-3B está alterada também em outros transtornos psiquiátricos conforme estudos recentemente conduzidos.

Na depressão, foi observado que pacientes idosos com transtorno depressivo maior apresentaram menores níveis de p(Ser9)-GSK-3B e menor razão entre p(Ser9)-GSK-3B e GSK-3B total (GSK-3Bt), indicando maior atividade enzimática (Diniz et al., 2011).

Foram observados menores níveis de p(Ser9)-GSK-3B e menor razão entre p(Ser9)-GSK-3B e GSK-3Bt, indicando maior atividade enzimática, e não foram encontradas diferenças entre os níveis de GSK-3Bt, em pacientes idosos com comprometimento cognitivo leve e doença de Alzheimer, quando comparados ao grupo controle (Forlenza et al., 2011).

2.7 Escala de avaliação das síndromes positiva e negativa

A escala de avaliação das síndromes positiva e negativa (PANSS) foi desenvolvida por Kay et al. em 1987 com a finalidade de suprir limitações dos instrumentos de avaliação existentes na época para os pacientes com esquizofrenia ambulatoriais ou hospitalizados. Tais limitações eram a avaliação da presença dos sintomas, sem considerar a gravidade do

mesmo; desbalanceamentos do número de itens em relação aos sintomas positivos e negativos; falta de evidências de monitoramento de melhora no quadro clínico decorrente do uso de antipsicóticos; falta de medida entre a predominância de sintomas positivos versus sintomas negativos; ausência de medida da psicopatologia geral e da sua possível influência na gravidade das síndromes positiva e negativa. A PANSS consiste em 3 sub-escalas, sendo que as escalas das síndromes positiva e negativa são formadas por 7 itens cada e a sub-escala da psicopatologia geral, por 16 itens. A cada item pode ser atribuída uma pontuação de 1 (ausência) a 7 (gravidade máxima). Uma vantagem da PANSS é o seu tempo médio de aplicação, 40 a 50 minutos (Kay et al., 1987).

Em um estudo publicado posteriormente, Kay et al. (1989) demonstraram a padronização psicométrica da PANSS. Foi observado que a pontuação da PANSS apresenta distribuição normal e consistência dos dados; estabilidade e precisão das medidas, concordância entre psiquiatras e índice de teste e re-teste adequados, além da validação da escala, quando consideradas diferentes associações entre diferenças históricas, culturais, fenomenológicas, genealógicas, psicométricas e farmacológicas, além de medidas de seguimento de pacientes. A PANSS pode ser considerada o instrumento de medida mais frequentemente utilizado em pacientes com esquizofrenia (Leucht et al., 2005).

No Brasil, é utilizada a versão traduzida e validada da PANSS (Vessoni, 1993; Chaves; Shirakawa, 2000). A escala foi traduzida para o português e depois retrotraduzida para o inglês e revisada por um psiquiatra

americano. Em um estudo de confiabilidade da versão brasileira em 24 pacientes ambulatoriais, a concordância entre dois entrevistadores foi alta na maioria dos itens da síndrome positiva. No entanto, em três itens da síndrome negativa (itens N4, N5 e N6), a concordância foi baixa (Vessoni, 1993). Chaves (1994) apresentou valores de concordância acima de 0,65 para esses itens, em estudo realizado com 83 pacientes.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar *in vivo* a influência do tratamento medicamentoso sobre a atividade de subtipos de PLA₂ e os níveis de GSK-3B total e fosforilada em plaquetas de pacientes com esquizofrenia.

3.2 Específicos

Comparar a atividade de subtipos de PLA₂ e os níveis de GSK-3B total e fosforilada entre plaquetas de pacientes com esquizofrenia sem tratamento medicamentoso e controles saudáveis;

Estudar o efeito do tratamento antipsicótico (clozapina; olanzapina em regime de monoterapia ou em associação com risperidona, ou haloperidol em regime de monoterapia ou associado com outro antipsicótico de 1ª geração) sobre as enzimas PLA₂ e GSK-3B plaquetárias;

Verificar possíveis correlações entre atividades de subtipos de PLA₂ e níveis de GSK-3B e pontuação total e sub-pontuações da PANSS, como potencial biomarcador de resposta terapêutica para a esquizofrenia.

4 MÉTODOS

Foram recrutados pacientes inicialmente livres de tratamento medicamentoso (grupo longitudinal – GL), dos quais se coletaram amostras de sangue (momento inicial). A estes pacientes do GL posteriormente foi prescrita a olanzapina (n = 10) ou o haloperidol (n = 6), ambos em regime de monoterapia, por 8 semanas. Após esse período, foi realizada outra coleta de sangue (tratamento 8 semanas) e esses pacientes constituíram o braço longitudinal desse estudo. Foram também recrutados 40 pacientes crônicos medicados e diagnosticados com esquizofrenia. Esses pacientes foram divididos em três grupos: uso de clozapina em regime de monoterapia (n = 20); olanzapina em regime de monoterapia ou em associação com risperidona (n=10); haloperidol em regime de monoterapia ou em associação com outro antipsicótico de 1^a geração (n = 10). Os pacientes foram recrutados dentre aqueles em atendimento ambulatorial no Instituto de Psiquiatria do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (IPq/ HCFMUSP). Esses sujeitos de pesquisa constituíram o braço transversal dessa pesquisa (grupo transversal – GT). Foi ainda recrutado um grupo controle (n = 20) com as características de sexo e idade pareadas com os pacientes. Esse pareamento foi realizado baseado na proporção de sujeitos dos grupos de pacientes do sexo masculino (75 %) e na mediana da idade (37 anos) dos pacientes pertencentes ao grupo transversal. Após aceitarem participar do estudo,

todos os pacientes e/ ou seus responsáveis legais e os sujeitos controle assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice A). Todas as amostras foram codificadas, assegurando-se a confidencialidade requerida. O projeto foi aprovado na Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do HCFMUSP em reunião realizada dia 24/09/2008 (protocolo número 0688/08) (Apêndice B). Trata-se de uma pesquisa experimental, não randomizada, não cega, com um braço longitudinal e outro transversal. Os pacientes do braço longitudinal aos quais foi prescrita a olanzapina (n = 10) são pertencentes ao Banco de Amostras do LIM-27. Os pacientes do braço longitudinal aos quais foi prescrito o haloperidol (n = 6) foram recrutados no período entre 13/07/2010 e 11/07/2011. Os pacientes do GL sob haloperidol participam do projeto de pesquisa intitulado “Investigação de endofenótipos e fatores prognósticos em psicoses de primeiro episódio: estudo longitudinal envolvendo aspectos clínicos, neuropsicologia, genética, neuroquímica e neuroimagem”, coordenado pelo Dr Paulo Sallet. Este projeto foi aprovado na CAPPesq em reunião realizada dia 16/12/2009 (protocolo número 1234/ 09) (Apêndice B). A amostra estudada na avaliação transversal foi a de pacientes com diagnóstico de esquizofrenia (F20) ou de transtorno esquizoafetivo (F25.9) em atendimento ambulatorial no IPq, recrutada no período entre 24/05/2010 e 12/05/2011. Os sujeitos considerados como grupo controle foram recrutados no período de 22/02/2011 a 01/04/2011 dentre os funcionários do IPq/ HCFMUSP.

Todas as etapas dessa pesquisa foram realizadas nas dependências do IPq/ HCFMUSP. Os experimentos foram executados no Laboratório de Neurociências (LIM-27).

As coletas de sangue foram realizadas sempre entre 8 e 10 horas da manhã e os pacientes estavam em jejum de 8 a 12 horas. O sangue coletado foi processado imediatamente após a coleta. Todo o procedimento de coleta e processamento de amostra foi realizado de acordo com protocolo padronizado no LIM-27. Imediatamente após o processamento das amostras, as mesmas foram armazenadas em freezer na temperatura de -70°C .

As características sócio-demográficas e clínicas foram coletadas com auxílio de Protocolo de Entrevista já estabelecido no Grupo de Psicoses do LIM-27 (GPL27), o qual contempla perguntas sobre o estado geral da doença (tempo de evolução; número de hospitalizações, de procedimentos médicos; tentativa de suicídio; idade de surgimento da doença; abuso de substâncias psicoativas; histórico familiar de doença psiquiátrica; presença de comorbidades não psiquiátricas, etc.). A avaliação diagnóstica de todos os pacientes foi realizada por meio da Entrevista Clínica Estruturada para o DSM-IV, Transtornos do Eixo I (SCID-I/P) (First et al., 2002a), em entrevista com os pacientes e familiares ou responsáveis. Foram excluídos pacientes com história prévia ou atual de dependência de álcool e/ou drogas (DSM-IV, APA, 2002). A psicopatologia foi avaliada por meio da Escala das Síndromes Positiva e Negativa – PANSS (Kay et al., 1987) (Apêndice C): subescalas positiva (7 itens), negativa (7 itens) e de psicopatologia geral (16

itens), com escores de 1 a 7, sendo maior a pontuação quanto maior a gravidade do sintoma. Os controles foram avaliados pela versão da mesma entrevista para não pacientes (SCID – I/ NP) (First et al., 2002b), tendo como critérios de exclusão história pessoal de transtornos psiquiátricos do Eixo I, tais como TAB, Transtorno Obsessivo Compulsivo, Psicoses Não Orgânicas, etc.

4.1 Recrutamento dos grupos de pesquisa

4.1.1 Pacientes inicialmente livres de tratamento medicamentoso aos quais foi prescrita a olanzapina ou o haloperidol

Esses grupos de pacientes foram analisados separadamente, pois o grupo inicialmente livre de tratamento medicamentoso ao qual foi prescrita a olanzapina foi constituído por pacientes com média de 5 anos de progressão de doença, enquanto que os pacientes alocados no grupo do haloperidol estavam com menos de seis meses de aparecimento de sintomas psicóticos.

4.1.1.1 Olanzapina

Os 10 pacientes incluídos nesse grupo inicialmente livres de tratamento medicamentoso (GL) e aos quais foi prescrita a olanzapina [idade entre 28 – 42 anos; dose média diária 9,5 (7,5 mg)] em monoterapia

foram recrutados por psiquiatras do IPq/ HCFMUSP durante a execução de outro projeto de pesquisa.

4.1.1.2 Haloperidol

Os 6 pacientes incluídos nesse grupo inicialmente livres de tratamento medicamentoso (GL), aos quais foi prescrito o haloperidol via oral em regime de monoterapia [idade entre 18 – 44 anos; dose média diária 3,5 (2,3) mg; mediana = 2,5 mg/ dia], foram recrutados em primeiro episódio psicótico. Estes pacientes foram internados no IPq/ HCFMUSP e aceitaram participar da pesquisa coordenada pelo Dr Paulo Sallet, que contempla o estudo dos possíveis biomarcadores avaliados nessa pesquisa.

4.1.2 Pacientes crônicos medicados e grupo controle

4.1.2.1 Clozapina e Olanzapina

Os 20 pacientes em uso de clozapina (idade entre 26 – 55 anos) como único antipsicótico [dose média diária 517,5 (151,5 mg); mediana = 600 mg/ dia] (GT) foram recrutados dentre aqueles atendidos pelo Ambulatório de Psicoses do LIM-27, coordenado pelo Dr Martinus Th van der Bilt.

Os 10 pacientes em uso de olanzapina [idade entre 28 – 50 anos; dose média diária 15,5 (5,5 mg); mediana = 15 mg/ dia] em monoterapia ou associada com risperidona [n = 4/ 10, dose média diária 5,0 (2,1) mg;

mediana = 4,5 mg/ dia] (GT) foram recrutados dentre aqueles atendidos pelo Ambulatório de Psicoses do LIM-27, coordenado pelo Dr Martinus Th van der Bilt.

4.1.2.2 Haloperidol em regime de monoterapia ou em associação com outro antipsicótico de primeira geração

Os 10 pacientes incluídos nesse grupo (idade entre 29 – 59 anos) foram sistematicamente localizados e convidados a participarem da pesquisa. O fluxograma do recrutamento está disposto no Anexo. A dose média de haloperidol via oral foi [n = 7/ 10, dose média diária 6,4 (2,4) mg; mediana = 5,0 mg/ dia] e o número médio de ampolas por mês do decanoato de haloperidol (medicação de depósito) foi [n = 5/ 10, média mensal de ampolas 5 (2) unidades; mediana = 5 ampolas/ mês] (GT). A dois pacientes o haloperidol foi prescrito via oral e na forma de depósito. Cada ampola consiste em 1,0 mL contendo 70,52 mg de decanoato de haloperidol, o que equivale a 50 mg de haloperidol.

4.1.2.3 Controles

Os 20 indivíduos considerados como controles (idade entre 27 – 51 anos) foram recrutados dentre os funcionários do IPq/ HCFMUSP, de acordo com o pareamento por sexo e idade com os pacientes. Todos

responderam a uma entrevista sócio-demográfica e foram avaliados pelo Dr Rodrigo Machado-Vieira.

4.2 Critérios de inclusão e de exclusão

Para os pacientes inicialmente livres de tratamento medicamentoso (GL), os critérios de inclusão para os que iniciaram o tratamento com olanzapina foram diferentes daqueles adotados para os pacientes que iniciaram o tratamento com haloperidol. Os critérios de inclusão para os pacientes do grupo da olanzapina foram diagnóstico definido de esquizofrenia, idade entre 18 e 50 anos e ambos os sexos. Alguns destes pacientes passaram por períodos de *wash-out* de pelo menos 15 dias; outros não haviam usado antipsicóticos previamente. Dados mais específicos sobre o status medicamentoso destes pacientes não foram recuperados. Os critérios de exclusão foram baixa escolaridade e presença de comorbidades psiquiátricas.

Os critérios de inclusão para os pacientes do grupo do haloperidol (GL) foram idade entre 18 e 59 anos; ambos os sexos; período inferior a 6 meses do aparecimento dos sintomas psicóticos. Os critérios de exclusão foram história prévia ou atual de abuso de álcool/ drogas; histórico de hidrocefalia, traumatismo craniano, uso de próteses metálicas (pois estes pacientes fazem exame de neuroimagem no projeto mais abrangente do qual participam).

Os critérios de inclusão para cada um dos grupos de pacientes crônicos medicados (GT) foram idade entre 18 e 59 anos; ambos os sexos; diagnóstico de esquizofrenia ou de transtorno esquizoafetivo; administração de clozapina, olanzapina em regime de monoterapia ou associada com risperidona, ou haloperidol em regime de monoterapia ou associado com outro antipsicótico de 1ª geração, todos com os mesmos antipsicóticos há pelo menos 6 meses. Os critérios de exclusão foram não adesão ao tratamento medicamentoso; baixa escolaridade (menor do que 4 anos de estudo); não estabilização do quadro psicótico; presença de comorbidades psiquiátricas.

Os critérios de inclusão para os sujeitos do grupo controle foram idade entre 18 e 59 anos; ambos os sexos; ausência de transtorno psiquiátrico, verificada pelo SCID – I/ NP (First et al., 2002b). Os critérios de exclusão foram uso de fármacos de ação central, presença de doenças como diabetes, quadros inflamatórios, neoplasias e anemia falciforme.

4.3 Preparo e acondicionamento das amostras

Foram coletados 20 mL de sangue em dois tubos com capacidade de 10 mL cada, contendo anticoagulante citrato de sódio 0,106 mol/ L. Em cada tubo adicionou-se 1 mL de ACD-NH-Formol-A [glicose 22,3 g; ácido cítrico 8,68 g; citrato de sódio di-hidratado 24,7 g; água ultra-pura quantidade suficiente para (qsp) 1 L]. Os tubos foram homogeneizados delicadamente por inversão e centrifugados durante 15 minutos, 515 g, em

temperatura ambiente (TA). A seguir, os sobrenadantes (plasma rico em plaquetas, PRP) foram transferidos para um tubo plástico com fundo cônico e o pH ajustado para 6,5 com ACD-NH-Formol-A. O PRP foi transferido para 2 tubos de poliestireno (4 a 5 mL/ tubo) e centrifugado durante 10 minutos, 1159 g, TA. O sobrenadante foi removido cuidadosamente por inversão e, ao *pellet*, adicionou-se 2,5 mL de solução de lavagem [30 mL de citrato de sódio 0,1 M; 3,3 mL de cloreto de potássio 0,155 M; 1,0 mL de cloreto de magnésio 0,1 M; 1,5 mL de glicose 0,33 M; 2,5 mL de apyrase 2 mg/ mL (A6535, Sigma Aldrich); 2,0 mL de cloreto de cálcio 0,1 M; cloreto de sódio 0,9 % qsp 100 mL]. Após repouso de 10 minutos, o *pellet* de plaquetas foi homogeneizado cuidadosamente com uma pipeta *Pasteur* até total diluição e adicionou-se mais 2,5 mL de solução de lavagem. A suspensão foi centrifugada por 8 minutos, 1159 g, TA; o sobrenadante foi removido cuidadosamente, e o *pellet* foi ressuspendido com 0,5 mL de Tris-sacarose 50 mM pH 7,4 e homogeneizado com pipeta plástica. As plaquetas em Tris-sacarose foram armazenadas em dois criotubos e uma alíquota de 50 µL foi reservada para dosagem de proteínas. As plaquetas foram armazenadas em freezer -70° C para posterior dosagem de proteínas e para os ensaios de determinação da atividade de subtipos de PLA₂ e níveis de GSK-3B total e fosforilada.

4.4 Dosagem de proteínas

A dosagem de proteínas foi realizada pelo método de Lowry (Lowry et al., 1951) modificado (kit 500-0116, BioRad, Filadelfia, PA, Estados Unidos), devido à presença de substâncias anfipáticas no meio de conservação das plaquetas. Para a determinação das proteínas totais, foi utilizada uma curva padrão de proteínas empregando-se albumina de soro bovino (A-3782, Sigma-Aldrich), nas seguintes concentrações: 0,1 mg/ mL, 0,2 mg/ mL, 0,5 mg/ mL, 1,0 mg/ mL e 1,5 mg/ mL. O ensaio foi realizado em microplacas de 96 poços (em temperatura ambiente), e consistiu na adição de 5 μ L de amostra, 25 μ L do Reagente A e 200 μ L do Reagente B. O branco da reação consistiu de Tris-sacarose 50 mM pH 7,4 e este também foi o diluente das amostras, as quais foram diluídas 1:3, v/v. Após incubação de 15 minutos em temperatura ambiente sob agitação (Wallac, PerkinElmer, Boston, MA, Estados Unidos) de cerca de 500 rotações por minuto (rpm), as absorvâncias das amostras foram obtidas com auxílio de um leitor de microplacas (Zenyth 200 Spectrophotometer, Áustria), no comprimento de onda fixo de 680 nm. Todas as amostras foram analisadas em triplicata e o coeficiente de variação máximo observado foi de 5 %.

4.5 Determinação da atividade de subtipos da enzima fosfolipase A₂

O método utilizado para determinar a atividade de subtipos de PLA₂ (iPLA₂, cPLA₂, sPLA₂) foi o radioenzimático, descrito previamente (Flesch et

al., 1985; Gattaz et al., 1995, 1996; Talib, 2006). O preparo das amostras e das reações enzimáticas foi executado em banho de gelo.

Após determinação dos níveis de proteínas, foi pipetado um volume de cada amostra necessário para se obter uma concentração de proteína final de 0,2 mg/ mL (para 2,5 mL de volume total). O volume da amostra foi completado para 1,0 mL com Tris-sacarose 50 mM pH 7,4 (tampão de lise) e adicionou-se 1,5 mL de Tris 50 mM pH 7,5. A amostra referente ao branco continha 1,0 mL de Tris-Sacarose 50 mM pH 7,4 e 1,5 mL de Tris 50 mM pH 7,5.

Os substratos da enzima utilizados foram o L- α -1-palmitoil-2-araquidonil-fosfatidilcolina marcada com [$1\text{-}^{14}\text{C}$] na cauda araquidonil na posição *sn*-2 (araquidonil-1- ^{14}C -PC) (PerkinElmer, Boston, MA, Estados Unidos) para os subtipos cPLA₂ e sPLA₂ e o L-3-fosfatidilcolina, 1-palmitoil-2-[$1\text{-}^{14}\text{C}$] palmitoil (PerkinElmer, Boston, MA, Estados Unidos) para a iPLA₂. Cada um dos substratos radioativos (SR) foi diluído em solução contendo hidroxitolueno butilado (BHT) (solução 1: 70 mg de BHT em 500 μL de etanol/ tolueno, 1:2, v/ v; solução 2: 10 μL da solução 1 em 10 mL de etanol/ tolueno, 1:2, v/ v). Para o araquidonil, o substrato radioativo foi diluído na solução 2, na proporção 1:10 v/ v e para o palmitoil, a diluição foi de 1:5 v/ v, na solução 2. Em cada ensaio, foram reservados 12 μL de SR para cada reação. Esse volume total foi evaporado em nitrogênio gasoso, ressuspendido com 150 μL de albumina de soro bovina (A6003, Sigma-Aldrich – 0,33 mg/ mL em água ultra pura) e sonificados em lavadora ultrassônica (modelo 5510, Branson Ultrasonics Corporation, CR, Estados

Unidos) durante 5 minutos (araquidonil) ou 3 minutos (palmitoil) para a formação de micelas.

Devido às diferentes características dos subtipos de PLA₂, as reações foram preparadas considerando a otimização da reação enzimática. Para a iPLA₂, foram adicionados, nessa ordem: 50 µL de Tris 1 M pH 7,5; 100 µL de ácido etileno-diamino tetracético (EDTA) 5 mM; 200 µL de amostra; 150 µL de SR. Para a cPLA₂, foram adicionados, nessa ordem: 50 µL de Tris 1 M pH 8,5; 100 µL de cálcio 500 µM; 150 µL de SR. Para a sPLA₂, foram adicionados, nessa ordem: 50 µL de Tris 1 M pH 8,5; 100 µL de cálcio 25 mM; 200 µL de amostra; 150 µL de SR.

As condições otimizadas para a reação dos subtipos de PLA₂ em plaquetas são tempo de incubação de 30 minutos e temperatura de 37 °C, sob agitação, em banho-maria (Techne SB-16, Bibby Scientific Limited, Reino Unido). Após incubação, as amostras foram colocadas imediatamente em banho de gelo e foram adicionados 700 µL de solução de parada contendo ácido clorídrico/ isopropanol (1:12, v/v), para interromper a reação.

Em seguida, as amostras foram deixadas à temperatura ambiente e, após 10 min de repouso, foram adicionados 700 µL de *n*-heptano, para extração do ácido graxo marcado, através de agitação vigorosa em vórtex por 30 s. A mistura foi então, centrifugada a 1700 *g*, 10 min, TA. Transferiu-se 500 µL da fase orgânica para tubos contendo 60 mg de sílica gel (código 101799, Merck, Alemanha) e 300 µL de *n*-heptano para reter os fosfolípidos e centrifugou-se novamente a 1700 *g*, 10 min, TA. Transferiu-se 500 µL do sobrenadante para tubos contendo 6,0 mL de líquido de cintilação

(OptiPhase 'Hi-Safe', Perkin Elmer, MA, Estados Unidos) e após homogeneização, as contagens por minuto (CPM) foram obtidas com o auxílio de um contador de cintilação líquida (Tri-Carb 2100 TR, Perkin Elmer, MA, Estados Unidos) na seguinte ordem: branco (clivagem espontânea do SR), 100 % (somente o substrato marcado) e amostras.

Os resultados, fornecidos em CPM, foram convertidos para pmol/ mg de proteína/ min utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Atividade da PLA}_2 \text{ (pmol/ mg prot/ min)} = \text{CPM} \times 25 / A \times 0,954 \times 2,22 \times B$$

Sendo, CPM = contagens por minuto; 25 = fator de ajuste para 1 mg de proteína (1 mg/ 0,04 mg concentração final de proteína); A = atividade específica do radioativo em mCi/ mmol; B = tempo de incubação em minutos; 0,954 = eficiência do equipamento.

A atividade dos subtipos de PLA₂ foi depois multiplicada por 10³, e expressa em fentomol/ mg proteína/ minuto.

4.6 Determinação dos níveis de GSK-3 beta total e fosforilada (Ser9)

Os níveis de GSK-3Bt e p(Ser9)-GSK-3B foram avaliados utilizando kits reagentes para ensaio imuno enzimático (Enzo Life Sciences, MI, Estados Unidos).

A concentração de proteínas de todas as amostras foi normalizada para 0,05 mg/ mL para GSK-3Bt e 0,1 mg/ mL para p(Ser9)-GSK-3B. O

protocolo foi executado seguindo as instruções do fabricante. Cada amostra foi analisada em duplicata.

Resumidamente, as amostras foram inicialmente diluídas 1:2, v/v, em tampão *Radio Immuno Precipitation Assay* (RIPA) (fornecido no kit), acrescido de inibidores de proteases [para GSK-3Bt e p(Ser9)-GSK-3B], fluoreto de fenil-metil-sulfonil (PMSF) (Sigma-Aldrich, P8340), coquetel inibidor de protease (PIC) (Sigma-Aldrich, R7626), e de fosfatases [somente para p(Ser9)-GSK-3B], pirofosfato de sódio (Sigma-Aldrich, S6422) e ortovanadato de sódio (Sigma-Aldrich, S6508).

As concentrações dos padrões de GSK-3Bt variaram de 78,1 a 5000 pg/ mL em diluições seriadas (7 pontos) e de p(Ser9)-GSK-3B, de 62,5 a 2000 pg/ mL, também em diluições seriadas (6 pontos). O tampão de amostra (fornecido no kit) foi acrescido dos inibidores de proteases somente no momento do uso, o qual foi utilizado como branco.

O ensaio consistiu na adição de 100 µL de branco, padrões e amostra em cada poço, em duplicata, seguida de incubação por 1 hora, com agitação de cerca de 500 rpm, à temperatura ambiente. A seguir, as placas foram lavadas 5 vezes (para GSK-3Bt) ou 4 vezes [para p(Ser9)-GSK-3B] com tampão de lavagem (400 µL/ poço/ lavagem). A seguir, com o poço seco, foram adicionados 100 µL de solução contendo o anticorpo (Ac) policlonal para GSK-3Bt ou p(Ser9)-GSK-3B, exceto no branco. Novamente, a placa foi incubada por 1 hora, com agitação de cerca de 500 rpm, à temperatura ambiente e, ao final desse período, foram repetidas as lavagens com o tampão de lavagem. A seguir, foram adicionados 100 µL do

Ac conjugado com *horseradish peroxidase* seguido de incubação por 30 minutos, com agitação de cerca de 500 rpm, à temperatura ambiente, exceto no branco, e ao final desse período, foram repetidas as lavagens com o tampão de lavagem. Após esse período, foram adicionados 100 µL do substrato tetra-metil-benzidina em todos os poços, seguido de incubação por 30 min, sob agitação, à temperatura ambiente, seguida da adição de 100 µL da solução de parada (ácido clorídrico 1 N). A densidade óptica foi determinada em 450 nm, com o desconto no branco, com o auxílio de um espectrofotômetro para placas (Zenyth 200 Spectrophotometer, Austria). A curva de calibração (regressão logística de quatro parâmetros) foi calculada com o auxílio do *software GraphPad Prism* versão 5.0.

Os níveis de GSK-3B total e fosforilada foram expressos em µg/ g de proteína total. A atividade de GSK-3B foi indiretamente inferida pela relação [p(Ser9)-GSK-3B/ GSK-3Bt], que representa a porção inativa da enzima, e foi expressa em porcentagem.

4.7 Análise estatística

Os dados foram apresentados em tabelas e gráficos. Para a comparação de médias do grupo de pacientes inicialmente livres de tratamento medicamentoso com o grupo controle, foi utilizado o teste não paramétrico U de *Mann-Whitney*. Para a comparação de médias do grupo de pacientes inicialmente livres de tratamento medicamentoso e após a administração de olanzapina ou haloperidol por 8 semanas (grupo

longitudinal), foi utilizado o teste não paramétrico *Wilcoxon*. Para a comparação de médias entre o grupo de pacientes inicialmente livres de tratamento medicamentoso (GL) com o grupo controle ou os pacientes crônicos medicados, foi utilizado o teste não paramétrico U de *Mann-Whitney*. Para a comparação de médias entre os grupos dos pacientes crônicos medicados (grupo transversal) e o grupo controle, foi utilizado o teste não-paramétrico *Kruskal-Wallis* seguido de *Tamhane* como post-hoc. Para verificar associações entre variáveis categóricas, foi realizado o teste qui-quadrado. Para verificar correlações entre duas variáveis quantitativas, foi utilizado o coeficiente de correlação de *Spearman*. Optou-se por utilizar testes não paramétricos porque embora os dados fossem homocedásticos (teste de *Levene*), a distribuição não seguiu uma curva normal (teste de *Kolmogorov Smirnov*) para a atividade de subtipos de PLA₂. Análise discriminante foi realizada inicialmente envolvendo os grupos de pacientes crônicos (GT), divididos de acordo com os diferentes regimes terapêuticos, e o grupo controle. Posteriormente, a análise discriminante foi realizada envolvendo o grupo de pacientes crônicos medicados (GT) como um todo, independente do antipsicótico administrado, e o grupo controle. Análises de comparações das enzimas avaliadas por sexo, idade ou dose diária não revelaram diferenças significativas. Valores extremos ou estranhos foram justificados e retirados do banco de dados. O nível de significância adotado foi de 0,05 e todos os testes foram bicaudais. As análises foram realizadas com auxílio do software *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS)

versão 13.0 para *Windows* (Chicago, IL, Estados Unidos) e *Graphpad Prism*

versão 5.0 para *Windows* (La Jolla, CA, Estados Unidos).

5 RESULTADOS

5.1 Características sócio-demográficas e clínicas dos participantes

Na Tabela 1 são apresentadas as características sócio-demográficas dos pacientes avaliados longitudinalmente (GL) nesse estudo. Os pacientes aos quais foi administrada a olanzapina durante 8 semanas foram recrutados em outro momento, anterior a esse estudo, e quando não havia sido padronizado o protocolo de entrevista do GPL27, quando as únicas características sócio-demográficas coletadas eram a idade e o sexo.

Tabela 1 – Características sócio-demográficas dos pacientes participantes desse estudo, avaliados em dois momentos

Variáveis	OLA (n = 10)	HA (n=6)
Sexo		
Masculino	6 (60)	4 (67)
Feminino	4 (40)	2 (33)
Etnia	NC	
Caucasiana		3 (50)
Não caucasiana		3 (50)
Estado civil	NC	
Solteiro		4 (67)
Companheiro fixo/ casado		2 (33)
Divorciado/ separado		0
Viúvo		0
Idade (anos)	35,4 (5,0)/ 35,5	27,0 (9,5)/ 24,5
Escolaridade (anos)	NC	10,4 (4,7)/ 11
IMC (kg/cm ²)	NC	22,6 (3,7)/ 23,5

HA = haloperidol; IMC = índice de massa corporal; NC = não coletado; OLA = olanzapina; as variáveis categóricas foram expressas em frequência absoluta (frequência relativa); as variáveis quantitativas foram expressas em média (desvio-padrão)/ mediana

A idade dos pacientes aos quais foi prescrita a olanzapina tendeu a ser maior do que a idade dos pacientes em uso de haloperidol ($p = 0,056$, teste U de *Mann-Whitney*).

As características sócio-demográficas dos quatro grupos de pesquisa do braço transversal do estudo são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 – Características sócio-demográficas dos participantes do braço transversal do estudo

Variáveis	CLO (n = 20)	OLA (n = 10)	HA (n=10)	CONT (n=20)	Estatística (χ^2 / gl/ p)
Sexo					0,71/ 3/ 0,870
Masculino	15 (75)	6 (60)	7 (70)	14 (70)	
Feminino	5 (25)	4 (40)	3 (30)	6 (30)	
Etnia					8,11/ 3/ 0,044
Caucasiana	17 (85)	7 (70)	4 (40)	10 (50)	
Não caucasiana	3 (15)	3 (30)	6 (60)	10 (50)	
Estado civil					28,88/ 9/ 0,001
Solteiro	17 (85)	9 (90)	9 (90)	6 (30)	
Companheiro fixo/ casado	1 (5)	0	1 (10)	13 (65)	
Separado	1 (5)	1 (10)	0	1 (5)	
Viúvo	1 (5)	0	0	0	
Idade	38,1(8,8)/ 37	38,0(8,8)/ 37,5	41,0(9,6)/ 40	37,5(6,5)/ 37	0,89/ 3/ 0,828
Escolaridade	9,2 (2,8)/ 10	12,0(2,5)/ 11	9,8(3,7)/ 11	12,5(2,5)/ 11,5	14,30/ 3/ 0,003
IMC (kg/cm ²)	28,0(6,5)/ 26,9	25,2(3,7)/ 24,5	27,8(3,1)/ 28,8	26,8(4,7)/ 25,6	1,42/ 3/ 0,700

CLO = clozapina; CONT = controle; gl = graus de liberdade; HA = haloperidol; IMC = índice de massa corporal; OLA = olanzapina; p = significância do teste; χ^2 = valor do qui-quadrado no teste de qui-quadrado ou da estatística no teste assintótico de *Kruskal-Wallis*; as variáveis categóricas foram expressas em frequência absoluta (frequência relativa); as variáveis quantitativas foram expressas em média (desvio-padrão)/ mediana e foram expressas em anos, exceto IMC

Em relação às características sócio-demográficas, para os pacientes crônicos medicados (GT) e grupo controle foi observada uma associação entre ser casado e pertencer ao grupo controle ($p = 0,001$, coeficiente Phi = 0,694). Além disso, a escolaridade dos pacientes pertencentes ao grupo da clozapina é menor do que dos sujeitos do grupo controle ($p = 0,001$).

Na Tabela 3 são apresentadas as características clínicas dos pacientes crônicos medicados (GT) participantes dessa pesquisa. Assim como ocorreu para as características sócio-demográficas, essas informações não foram coletadas para os pacientes livres de tratamento medicamentoso aos quais foi posteriormente prescrita a olanzapina (GL). No grupo inicialmente livre de tratamento medicamentoso ao qual foi posteriormente prescrito o haloperidol (GL) essas características foram coletadas. Esses pacientes estavam em primeiro episódio psicótico, com menos de 6 meses de evolução da doença. Sendo assim, os pacientes estavam na 1ª hospitalização; a média da idade é a mesma da idade do 1º surto; estes nunca realizaram ECT e também não tentaram suicídio e, de acordo com os manuais, ainda não possuíam tempo de evolução da doença suficiente para o diagnóstico da esquizofrenia.

A psicopatologia dos pacientes foi avaliada pela PANSS, em uma data próxima à coleta de sangue (± 15 dias) para os pacientes crônicos medicados (GT). Para os pacientes inicialmente livres de tratamento medicamentoso, não foi possível recuperar o valor individual de PANSS para aqueles aos quais foi prescrita a olanzapina (GL). Para os pacientes que receberam haloperidol (GL), a PANSS foi realizada no mesmo dia da

primeira coleta de sangue. Para os pacientes livres de tratamento medicamentoso e que foram tratados com haloperidol (GL) ($n = 6$), os valores da PANSS foram 14,5 (Q_1 - $Q_3 = 12,0 - 23,8$) para síndrome positiva; 8,5 (Q_1 - $Q_3 = 7,0 - 13,8$) para síndrome negativa; 25,0 (Q_1 - $Q_3 = 19,8 - 35,2$) para psicopatologia geral e 48 (Q_1 - $Q_3 = 40,5 - 70,5$) para PANSS total. As pontuações da PANSS nas sub-escalas e total para os pacientes crônicos medicados ($n = 40$) são apresentadas no Gráfico 1.

Gráfico 1. Pontuações nas sub-escalas (A) e total (B) da Escala de Síndromes Positiva e Negativa dos pacientes participantes desse estudo, de acordo com o antipsicótico prescrito. A pontuação dos pacientes em uso de haloperidol (GT) na psicopatologia geral é menor ($p = 0,039$) do que a observada nos pacientes em uso de clozapina (GT). Teste utilizado: *Kruskal Wallis* seguido de *Tamhane* como *post hoc*.

Tabela 3 – Características clínicas dos pacientes crônicos medicados, participantes dessa pesquisa

Variáveis	Clozapina (n = 20)	Olanzapina (n = 10)	Haloperidol (n=10)	Estatística (χ^2 / gl/ p)
Hospitalização				2,44/ 2/ 0,269
Sim	17 (85)	6 (60)	8 (80)	
Não	3 (15)	4 (40)	2 (20)	
Eletroconvulsoterapia				0,52/ 2/ 0,771
Sim	4 (20)	2 (20)	1 (10)	
Não	16 (80)	8 (80)	9 (90)	
Tentativa de suicídio				3,43/ 2/ 0,180
Sim	11 (55)	2 (20)	5 (50)	
Não	9 (45)	8 (80)	5 (50)	
Idade 1º surto	21,9 (5,8)/ 21	22,3 (6,7)/ 20,5	19,3 (6,5)/ 19,5	0,89/ 2/ 0,643
Idade 1ª hospitalização	29,3 (18,9)/ 25	26,3 (8,3)/ 26	20,9 (5,8)/ 21	2,58/ 2/ 0,275
Idade última hospitalização	33,1 (18,7)/27	36,2 (8,3)/ 38,5	29,4 (11,3)/ 33	2,11/ 2/ 0,348
Idade do diagnóstico	24,6 (6,9)/ 22,5	22,7 (6,7)/ 20,5	20,8 (5,3)/ 21	1,61/ 2/ 0,447
Tempo doença	15,8 (5,4)/ 15	15,5 (8,7)/ 12	21,7 (8,8)/ 21,5	4,64/ 2/ 0,098
Número de hospitalizações	3,4 (2,9)/ 2	2,0 (1,0)/ 2	7,0 (8,8)/ 4	1,75/ 2/ 0,416

gl = graus de liberdade; p = significância do teste; χ^2 = valor do qui-quadrado no teste de qui-quadrado ou da estatística no teste assintótico de Kruskal-Wallis; as variáveis categóricas foram expressas em número de elementos (porcentagem); as variáveis quantitativas foram expressas em média (desvio-padrão)/ mediana e foram expressas em anos, exceto número de hospitalizações (se aplica somente aos pacientes que já foram hospitalizados)

5.2 Atividade de subtipos de fosfolipase A₂

5.2.1 Pacientes livres de tratamento medicamentoso e grupo controle

A atividade dos subtipos iPLA₂, cPLA₂ e sPLA₂ dos pacientes inicialmente livres de tratamento medicamentoso foi comparada com o grupo controle. Foi observada maior atividade de iPLA₂ nos pacientes com média de 5 anos de doença quando comparados com o grupo controle ($p < 0,01$). Para o subtipo cPLA₂ não foram observadas diferenças significativas entre os pacientes não medicados e o grupo controle. Foi observada maior atividade do subtipo sPLA₂ nos pacientes com menos de 6 meses de desenvolvimento da doença quando comparada ao grupo controle ($p < 0,05$). Os Gráficos 2, 3 e 4 a seguir ilustram essas comparações.

Gráfico 2. Atividade do subtipo iPLA₂ nos pacientes livres de tratamento medicamentoso com 5 anos de doença (esquizofrenia) (D+5a) e menos de 6 meses de aparecimento dos sintomas psicóticos (D-6m) comparados com o grupo controle. A atividade de iPLA₂ foi maior nos pacientes D+5a quando comparados ao grupo controle. Os dados estão expressos com média e desvio-padrão e foram analisados por *Mann-Whitney*. *** $p < 0,001$

Gráfico 3. Atividade do subtipo cPLA₂ nos pacientes livres de tratamento medicamentoso com 5 anos de doença (esquizofrenia) (D+5a) e menos de 6 meses de aparecimento dos sintomas psicóticos (D-6m) comparados com o grupo controle. Não houve diferença de média entre os grupos. Os dados estão expressos com média e desvio-padrão e foram analisados por *Mann-Whitney*

Gráfico 4. Atividade do subtipo sPLA₂ nos pacientes livres de tratamento medicamentoso com 5 anos de doença (esquizofrenia) (D+5a) e menos de 6 meses de aparecimento dos sintomas psicóticos (D-6m) comparados com o grupo controle. A atividade de sPLA₂ foi maior nos pacientes D-6m quando comparados ao grupo controle. Os dados estão expressos com média e desvio-padrão e foram analisados por *Mann-Whitney*. * $p < 0,05$

5.2.2 Efeitos dos antipsicóticos sobre a atividade dos subtipos da fosfolipase A_2

5.2.2.1 Pacientes livres de tratamento medicamentoso e após o uso de olanzapina ou haloperidol por 8 semanas

No grupo de 10 pacientes inicialmente livres de tratamento aos quais foi posteriormente prescrita a olanzapina por 8 semanas (GL) foi observada uma diminuição significativa ($p < 0,01$) da atividade dos três subtipos de PLA_2 avaliados. No entanto, no grupo de pacientes inicialmente livres de tratamento aos quais foi posteriormente prescrito o haloperidol a diferença de atividade entre os dois momentos não atingiu significância estatística. Para o grupo de pacientes que receberam o haloperidol, essa análise de comparação (teste de *Wilcoxon*) foi realizada com somente 5 pacientes, pois no momento inicial da pesquisa um paciente apresentou nível de proteína muito baixo (repetido e confirmado), e todo o volume do preparo de plaquetas (1 mL) não seria suficiente para a dosagem da atividade dos subtipos de PLA_2 .

A comparação da atividade dos subtipos de PLA_2 avaliados, tanto para os pacientes que receberam a olanzapina quanto para aqueles que receberam o haloperidol, é apresentada nos Gráficos 5, 6 e 7.

Gráfico 5. Atividade de iPLA₂ nos pacientes inicialmente livres de tratamento medicamentoso e após o uso de A) olanzapina ou B) haloperidol por 8 semanas (GL). Para os pacientes aos quais foi prescrita a olanzapina, foi observada uma diminuição significativa da atividade de iPLA₂ ($p < 0,01$). Para os pacientes aos quais foi prescrito o haloperidol, não houve diferença de médias entre os dois momentos ($p = 0,705$). Os resultados estão expressos em média e desvio-padrão e foram analisados por *Wilcoxon*

Gráfico 6. Atividade de cPLA₂ nos pacientes inicialmente livres de tratamento medicamentoso e após o uso de A) olanzapina ou B) haloperidol por 8 semanas (GL). Para os pacientes aos quais foi prescrita a olanzapina, foi observada uma diminuição significativa da atividade de cPLA₂ ($p < 0,01$). Para os pacientes aos quais foi prescrito o haloperidol, não houve diferença de médias entre os dois momentos ($p = 0,416$). Os resultados estão expressos em média e desvio-padrão e foram analisados por *Wilcoxon*

Gráfico 7. Atividade de sPLA₂ nos pacientes inicialmente livres de tratamento medicamentoso e após o uso de A) olanzapina ou B) haloperidol por 8 semanas (GL). Para os pacientes aos quais foi prescrita a olanzapina, foi observada uma diminuição significativa da atividade de sPLA₂ ($p < 0,01$). Para os pacientes aos quais foi prescrito o haloperidol, não houve diferença de médias entre os dois momentos ($p = 0,686$). Os resultados estão expressos em média e desvio-padrão e foram analisados por *Wilcoxon*

Foi observada diferença significativa para atividade dos subtipos de PLA₂ somente para os pacientes que receberam olanzapina por 8 semanas (GL). Por isso, para esse grupo a atividade de subtipos de PLA₂ (inicial e após 8 semanas de tratamento – tratamento agudo) foi comparada com o grupo controle e com os pacientes crônicos medicados (GT) que receberam olanzapina (tratamento de longa duração) (comparações dois a dois).

Após as 8 semanas de tratamento com olanzapina (GL), somente a atividade da iPLA₂ continuou aumentada quando comparada ao grupo controle ou aos pacientes crônicos medicados (GT) ($p = 0,005$ e $< 0,001$, respectivamente). Ambas cPLA₂ e sPLA₂ apresentaram reduções com relação ao *baseline*, atingindo níveis semelhantes aos controles e pacientes crônicos medicados.

O Gráfico 8 ilustra as comparações (sempre dois a dois) da atividade do subtipo iPLA₂ nos pacientes inicialmente livres de medicamento aos quais foi prescrita a olanzapina, (1) no momento inicial e (2) após 8 semanas de tratamento medicamentoso (GL), (3) nos pacientes crônicos medicados exclusivamente com olanzapina (GT) e (4) no grupo controle.

Gráfico 8. Comparação da atividade de iPLA₂ nos pacientes inicialmente livres de tratamento medicamentoso e após o uso de olanzapina por 8 semanas – tratamento agudo, pacientes crônicos medicados com olanzapina – tratamento prolongado e o grupo controle. Embora a atividade de iPLA₂ tenha aumentado ($p = 0,004$ com 8 semanas de tratamento com olanzapina, esta permaneceu maior do que a observada nos pacientes crônicos e no grupo controle ($p < 0,001$ e $0,005$, respectivamente). Os resultados estão expressos em média e desvio-padrão e foram analisados pelo teste U de *Mann-Whitney* e *Wilcoxon*. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

5.2.2.2 Pacientes crônicos medicados e grupo controle

Não foram observadas diferenças na atividade dos subtipos de PLA₂ avaliados, iPLA₂, cPLA₂ e sPLA₂, entre os grupos de pacientes crônicos medicados (GT) e o grupo controle, conforme pode ser observado nos Gráficos 9, 10 e 11, respectivamente.

Gráfico 9. Atividade do subtipo iPLA₂ nos diferentes grupos de pesquisa (GT). Não houve diferença de médias entre os grupos ($p = 0,922$). Os resultados estão expressos em média e desvio-padrão e foram analisados por *Kruskal Wallis*

Gráfico 10. Atividade do subtipo cPLA₂ nos diferentes grupos de pesquisa (GT). Não houve diferença de médias entre os grupos ($p = 0,424$). Os resultados estão expressos em média e desvio-padrão e foram analisados por *Kruskal Wallis*

Gráfico 11. Atividade do subtipo sPLA₂ nos diferentes grupos de pesquisa (GT). Não houve diferença de médias entre os grupos ($p = 0,605$). Os resultados estão expressos em média e desvio-padrão e foram analisados por *Kruskal Wallis*

5.3 Determinação dos níveis de GSK-3 beta total e fosforilada (Ser9)

5.3.1 Pacientes livres de tratamento medicamentoso e grupo controle

Os níveis de GSK-3Bt e p(Ser9)-GSK-3B e a razão de GSK-3B dos pacientes inicialmente livres de tratamento medicamentoso foram comparados com o grupo controle. Foi observado menor nível de GSK-3Bt e p(Ser9)-GSK-3B nos pacientes com média de 5 anos de doença quando comparados com o grupo controle ($p < 0,001$ e $< 0,05$, respectivamente). Para a razão de GSK-3B, que infere a inatividade da enzima, não foram observadas diferenças entre os grupos. Para os pacientes com menos de 6 meses de desenvolvimento da doença não foram observadas diferenças significativas nessas avaliações. Os Gráficos 12, 13 e 14 ilustram essas comparações.

Gráfico 12. Nível de glicogênio sintase quinase-3 beta total nos pacientes livres de tratamento medicamentoso com 5 anos de doença (esquizofrenia) (D+5a) e menos de 6 meses de aparecimento dos sintomas psicóticos (D-6m) comparados com o grupo controle. O nível de GSK-3Bt foi menor nos pacientes com média de 5 anos de doença (esquizofrenia) quando comparado ao grupo controle. Os dados estão expressos com média e desvio-padrão e foram analisados por *Mann-Whitney*. *** $p < 0,001$

Gráfico 13. Nível de glicogênio sintase quinase-3 beta fosforilada nos pacientes livres de tratamento medicamentoso com 5 anos de doença (esquizofrenia) (D+5a) e menos de 6 meses de aparecimento dos sintomas psicóticos (D-6m) comparados com o grupo controle. O nível de p(Ser9)-GSK-3B foi menor nos pacientes com média de 5 anos de doença (esquizofrenia) quando comparado ao grupo controle. Os dados estão expressos com média e desvio-padrão e foram analisados por *Mann-Whitney*. * $p < 0,05$

Gráfico 14. Razão entre GSK-3B fosforilada e total nos pacientes livres de tratamento medicamentoso com 5 anos de doença (esquizofrenia) (D+5a) e menos de 6 meses de aparecimento dos sintomas psicóticos (D-6m) comparados com o grupo controle. Não foram observadas diferenças significativas. Os dados estão expressos com média e desvio-padrão e foram analisados por *Mann-Whitney*.

5.3.2 Efeitos dos antipsicóticos sobre o nível e razão de glicogênio sintase quinase-3 beta

5.3.2.1 Pacientes livres de tratamento medicamentoso e após o uso de olanzapina ou haloperidol por 8 semanas

Foi observado aumento dos níveis de GSK-3B total e fosforilada somente para os pacientes aos quais foi prescrita a olanzapina (GL olanzapina). Para os pacientes inicialmente livres de tratamento medicamentoso aos quais foi prescrito o haloperidol (GL haloperidol) não foram observadas diferenças entre os níveis de GSK-3B total e fosforilada, conforme pode ser observado nos Gráficos 15 e 16. A razão entre GSK-3B total e fosforilada está ilustrada no Gráfico 17.

Gráfico 15. Nível de glicogênio sintase quinase-3 beta total nas plaquetas dos pacientes inicialmente livres de tratamento medicamentoso e após 8 semanas de tratamento com A) olanzapina ou B) haloperidol (GL). Para os pacientes aos quais foi prescrita a olanzapina, foi observada um aumento significativo dos níveis de GSK-3B ($p < 0,01$). Para os pacientes aos quais foi prescrito haloperidol, não houve diferença de médias entre os dois momentos ($p = 0,463$). Os resultados estão expressos em média e desvio-padrão e foram analisados por *Wilcoxon*

Gráfico 16. Nível de glicogênio sintase quinase-3 beta fosforilada (Ser9) nas plaquetas dos pacientes inicialmente livres de tratamento medicamentoso e após 8 semanas de tratamento com A) olanzapina ou B) haloperidol (GL). Para os pacientes aos quais foi prescrita a olanzapina, foi observada um aumento significativo dos níveis de p(Ser9)-GSK-3B ($p < 0,01$). Para os pacientes aos quais foi prescrito haloperidol, não houve diferença de médias entre os dois momentos ($p = 0,172$). Os resultados estão expressos em média e desvio-padrão e foram analisados por *Wilcoxon*

Gráfico 17. Razão entre GSK-3B fosforilada e total, inferindo a porcentagem dessa enzima no estado inativo, nos pacientes inicialmente livres de tratamento medicamentoso e após tratamento por 8 semanas com A) olanzapina ou B) haloperidol. Não houve diferença das médias para os pacientes em uso de olanzapina ($p = 0,241$) ou de haloperidol ($p = 0,075$). Os resultados estão expressos em média e desvio-padrão e foram analisados por *Wilcoxon*

Foi observada diferença significativa para os níveis de GSK-3B total e fosforilada somente para os pacientes que receberam olanzapina por 8 semanas (GL). Por isso, para esse grupo o nível de p(Ser9)-GSK-3B (inicial e após 8 semanas de tratamento – tratamento agudo) foi comparada com o grupo controle ou os pacientes crônicos medicados (GT) que receberam olanzapina (tratamento de longa duração) (comparações dois a dois).

Após as 8 semanas de tratamento com olanzapina (GL), o nível de p(Ser9)-GSK-3B não diferiu quando comparado ao grupo controle ou aos pacientes crônicos medicados (GT).

O Gráfico 18 ilustra as comparações (sempre dois a dois) do nível de p(Ser9)-GSK-3B nos pacientes inicialmente livres de tratamento medicamentoso aos quais foi prescrita a olanzapina, no momento inicial e após 8 semanas de tratamento (GL), nos pacientes crônicos medicados (GT) e no grupo controle.

Gráfico 18. Comparação do nível de p(Ser9)-GSK-3B nos pacientes inicialmente livres de tratamento medicamentoso e após o uso de olanzapina por 8 semanas, pacientes crônicos medicados e o grupo controle. O nível de p(Ser9)-GSK-3B aumentou ($p = 0,005$) com 8 semanas de tratamento com olanzapina, e não diferiu dos valores observados nos pacientes crônicos medicados e no grupo controle. Os resultados estão expressos em média e desvio-padrão e foram analisados pelo teste U de *Mann-Whitney*. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

5.3.2.2 Pacientes crônicos medicados e grupo controle

Não foram observadas diferenças entre os níveis de GSK-3Bt e p(Ser9)-GSK-3B entre os grupos de pacientes crônicos (GT) avaliados entre si e com o grupo controle, conforme pode ser observado no Gráfico 19. No grupo da clozapina, um paciente apresentou valores discrepantes para GSK-3Bt e p(Ser9)-GSK-3B e foi excluído da amostra. De fato, esse paciente apresentou uma concentração de proteína inicial 5 a 10 vezes

menor do que a dos demais sujeitos participantes da pesquisa (repetido e confirmado), o que provavelmente foi a causa desse valor discrepante.

Gráfico 19. Nível de glicogênio sintase quinase-3 beta nos diferentes grupos de pesquisa (GT). Não houve diferença de médias entre os grupos para a GSK-3B A) total ($p = 0,113$); B) fosforilada ($p = 0,233$). Os resultados estão expressos em média e desvio-padrão e foram analisados por *Kruskal Wallis*

A fração inativa da GSK-3B pode ser inferida pela razão entre p(Ser9)-GSK-3B e GSK-3Bt. O Gráfico 20 ilustra essa inferência.

Gráfico 20. Razão entre GSK-3B fosforilada e total, inferindo a porcentagem dessa enzima no estado inativo, por grupos (GT) ($p = 0,209$). Os resultados estão expressos em média e desvio-padrão e foram analisados por *Kruskal Wallis*

5.4 Correlações entre as variáveis quantitativas estudadas

5.4.1 Pacientes crônicos medicados

5.4.1.1 Correlações observadas com os pacientes reunidos em um único grupo

A atividade de subtipos de PLA₂ e os níveis de GSK-3B total e fosforilada, bem como a razão desses níveis não estavam alterados nos grupos de pacientes separados de acordo com o regime terapêutico e quando comparados ao grupo controle. No entanto, foram verificadas correlações entre essas proteínas e o estado clínico do paciente, medido por sub-pontuações e pontuação total da PANSS.

Inicialmente, as correlações foram realizadas com todos os pacientes em um único grupo. Foram verificadas correlações fracas significativas entre sPLA₂ e o somatório geral da PANSS ($r = - ,38$, $p = 0,017$, $n = 40$) (Gráfico 21). Foi também verificada correlação da pontuação da sub-escala da síndrome negativa da PANSS entre p(Ser9)-GSK-3B ($r = ,53$, $p < 0,001$, $n = 39$) e também com a razão entre p(Ser9)-GSK-3B e GSK-3Bt ($r = ,47$, $p = 0,003$, $n = 39$) (Gráfico 22). No entanto, essa correlação não foi observada com os níveis de GSK-3B total ($r = ,19$, $p = 0,245$, $n = 39$).

Gráfico 21. Correlação entre sPLA₂ e somatório geral da PANSS, quando avaliados todos os pacientes crônicos e medicados, participantes desse estudo ($n = 40$). Foi verificada uma correlação de *Spearman* fraca e negativa ($r = - ,38$, $p = 0,017$)

Gráfico 22. Correlação entre razão de GSK-3B e sub-escala negativa da PANSS, quando avaliados todos os pacientes crônicos e medicados, participantes desse estudo ($n = 39$). Foi verificada uma correlação de *Spearman* moderada e positiva ($r = ,47$, $p = 0,003$)

5.4.1.2 Correlações observadas em cada grupo de pacientes

5.4.1.2.1 Clozapina

A correlação entre p(Ser9)-GSK-3B e sub-escala de síndrome negativa da PANSS foi verificada quando analisados somente os pacientes em uso de clozapina ($r = ,569$, $p = 0,011$, $n = 19$) e essa correlação se manteve significativa com a razão entre p(Ser9)-GSK-3B e GSK-3Bt ($r = ,516$, $p = 0,024$, $n = 19$). Nesse grupo, os níveis de p(Ser9)-GSK-3B também se correlacionaram com o somatório geral da PANSS ($r = ,477$, $p = 0,039$, $n = 19$); no entanto, essa correlação não se manteve significativa com a razão entre p(Ser9)-GSK-3B e GSK-3Bt ($r = ,405$, $p = 0,085$, $n = 19$).

5.4.1.2.2 Olanzapina

Embora a correlação não tenha atingido nível de significância estatística, foi observada uma tendência de correlação positiva entre a atividade da p(Ser9)-GSK-3B e a sub-escala da síndrome negativa da PANSS nos pacientes em uso de olanzapina em monoterapia ou em associação com a risperidona ($r = ,606$, $p = 0,064$, $n = 10$).

5.4.1.2.3 Haloperidol

A correlação entre p(Ser9)-GSK-3B e sub-escala de síndrome negativa da PANSS foi verificada quando analisados somente aqueles pacientes em uso de haloperidol ($r = ,662$, $p = 0,050$, $n = 10$) e essa correlação se manteve significativa com a razão entre p(Ser9)-GSK-3B e GSK-3Bt ($r = ,756$, $p = 0,018$, $n = 10$).

5.4.2 Pacientes livres de tratamento medicamentoso e após o uso de olanzapina ou haloperidol por 8 semanas

5.4.2.1 Correlações observadas em cada grupo de pacientes

5.4.2.1.1 Olanzapina

Conforme descrito no item 5.1, os pacientes inicialmente livres de tratamento medicamentoso aos quais foi posteriormente prescrita a

olanzapina foram recrutados em outro momento e os valores das sub-escalas e total da PANSS não foram recuperados.

Entre os valores de atividade de subtipos de PLA₂ e níveis e razão de GSK-3B não foram encontradas correlações significativas ($p > 0,05$).

5.4.2.1.2 Haloperidol

Aos pacientes inicialmente livres de tratamento medicamentoso aos quais foi posteriormente prescrito o haloperidol foi aplicada a PANSS no momento inicial da pesquisa. Não foram observadas correlações significativas entre as pontuações das sub-escalas e total da PANSS e as determinações das enzimas avaliadas. Também não foram observadas correlações significativas entre a atividade de subtipos de PLA₂ e níveis e razão de GSK-3B ($p > 0,05$).

5.5 Análise discriminante

5.5.1 Entre os três grupos de pacientes crônicos medicados

Com a finalidade de verificar se, agrupadas, as características obtidas dos pacientes permitiriam sua classificação de acordo com o tratamento medicamentoso, foi realizada uma análise discriminante com os três grupos de pacientes crônicos medicados, em uso de (1) clozapina; (2) olanzapina em regime de monoterapia ou em associação com risperidona; (3)

haloperidol em regime de monoterapia ou em associação com antipsicótico de 1ª geração, todos a pelo menos 6 meses de tratamento. As variáveis utilizadas foram: atividade de subtipos de PLA₂ (iPLA₂, cPLA₂, sPLA₂), p(Ser9)-GSK-3B, GSK-3Bt, razão [p(Ser9)-GSK-3B/ GSK-3Bt], pontuação total da PANSS e de cada uma das sub-escalas (positiva, negativa e de psicopatologia geral), escolaridade e sexo. Foi utilizado método *stepwise* e estabelecidos o valor mínimo de F parcial em 3,84 para a entrada da variável na função e o valor máximo de F parcial em 2,71 para a retirada da variável na função. Nenhuma variável foi qualificada nessa análise, o que indica que, para as variáveis analisadas, os pacientes são homogêneos.

5.5.2 Entre o grupo de pacientes crônicos medicados como um todo e o grupo controle

Uma análise discriminante foi realizada para verificar se, agrupadas, as características obtidas dos pacientes crônicos medicados e do grupo controle permitiriam sua classificação em dois grupos distintos. As variáveis utilizadas foram: atividade de subtipos de PLA₂ (iPLA₂, cPLA₂, sPLA₂), p(Ser9)-GSK-3B, GSK-3Bt, [p(Ser9)-GSK-3B/ GSK-3Bt], escolaridade e sexo. Foi utilizado o método *stepwise* e estabelecidos o valor mínimo de F parcial em 3,84 para a entrada da variável na função e o valor máximo de F parcial em 2,71 para a retirada da variável na função. A variável qualificada nessa análise foi a escolaridade, com F igual a 9,94. No entanto, o objetivo de que agrupadas em uma função matemática as variáveis bioquímicas

distinguissem pacientes de controles não foi atingido e os grupos foram considerados homogêneos para essas análises.

6 DISCUSSÃO

Para o estudo de biomarcadores, o ideal é que os pacientes façam uso de somente um fármaco que atue sobre a molécula de estudo – nesse caso, as enzimas PLA₂ e GSK-3B, a fim de se evitar vieses da análise. A situação desejável para o estudo de biomarcadores seria o acompanhamento de uma coorte de pacientes com sintomas psicóticos, até a definição do diagnóstico, com posterior seguimento desses pacientes e também de seus familiares, devido à elevada influência genética para o desenvolvimento da esquizofrenia (concordância de 50 % para gêmeos monozigóticos). No entanto, como esse projeto foi desenvolvido em um Hospital de alta complexidade, a grande maioria dos pacientes já vem medicada a partir dos serviços de Atenção Primária de onde são oriundos. A título de informação, esses pacientes em atendimento ambulatorial são aqueles em que o tratamento na Atenção Primária e em centros de média complexidade não foi suficiente para a melhora e estabilização do quadro clínico. De qualquer forma, embora não fosse desejável que os pacientes utilizassem outros fármacos com mecanismo de ação no SNC, a dificuldade em se encontrar pacientes crônicos que preenchessem os critérios de inclusão, tornou obrigatória a inclusão de pacientes crônicos com esquizofrenia em uso de associações de antipsicóticos. O estudo de biomarcadores em uma amostra na qual essa associação medicamentosa não estivesse presente, embora fosse mais esclarecedor sobre o papel de cada fármaco sobre as enzimas

estudadas, teve essa limitação prática. De qualquer modo, uma amostra mais adequada aos propósitos do estudo tampouco poderia ser extrapolada para um número maior de pacientes, exceto provavelmente para aqueles na fase inicial da doença. Além disso, os biomarcadores periféricos estudados devem ser robustos o bastante para se fazerem notar frente ao uso de outros fármacos de ação central, especialmente antidepressivos, anticonvulsivantes e também antiparkinsonianos (biperideno) e anti-histamínicos (prometazina), que foram os medicamentos mais associados com os antipsicóticos avaliados nesse projeto.

A administração de outros fármacos, inclusive aqueles com ação sobre a PLA₂ (anti-inflamatórios, estrogênios) e GSK-3B (lítio, ácido valproico) já retratada na literatura, limita a verificação da atividade dos fármacos propostos sobre os biomarcadores periféricos testados. No entanto, essa medicação concomitante reflete a situação real dos pacientes com esquizofrenia, para os quais esses biomarcadores seriam possivelmente utilizados.

Em relação à atividade dos subtipos de PLA₂ entre os pacientes livres de tratamento medicamentoso, foi observado um aumento de iPLA₂ nos pacientes com média de 5 anos de doença e um aumento de sPLA₂ nos pacientes com menos de 6 meses de evolução de doença quando comparado com o grupo controle. O aumento de iPLA₂ nos pacientes com esquizofrenia corroboram achados da literatura que descrevem um aumento da atividade de PLA₂ total relacionado à esquizofrenia (Gattaz et al., 1987; 1990; 1995; Smesny et al., 2005). De fato, esse subtipo é o tipo

predominante em tecido cerebral (Jardim, 2005; Schaeffer, 2004) e é associado mais frequentemente ao remodelamento de fosfolípidos da membrana celular (Balsinde et al., 2005). Pacientes com menos de 6 meses de evolução da doença frequentemente apresentam um quadro inflamatório (Martínez-Gras et al., 2011), que pode ter sido evidenciado pelo aumento da atividade do subtipo sPLA₂.

A diminuição dos níveis de GSK-3B total e fosforilada observada nos pacientes com média de 5 anos de evolução da doença quando comparado ao grupo controle são inéditos na literatura em seres humanos, devendo ser replicados em uma amostra maior de pacientes. Estes sugerem que a GSK-3B possa ser uma enzima alvo para o tratamento da esquizofrenia, reforçando achados de estudos em animais (Alimohamad et al., 2005a; 2005b), nos quais foi demonstrado que os antipsicóticos aumentam os níveis de GSK-3B total em tecido cerebral de roedores.

Não foram encontradas diferenças significativas para os dois biomarcadores avaliados entre pacientes do GT e Controles, tampouco entre os diferentes grupos de pacientes do GT, separados pelo tipo de tratamento em uso, e o grupo controle. As Figuras 1 e 2, a seguir, ilustram uma possível explicação bioquímica para a ausência de diferença nas atividades de subtipos de PLA₂ e níveis de GSK-3B, com base no uso contínuo dos antipsicóticos.

3B. Em paralelo, a proteína G é ativada, estimula a ação da fosfolipase C (PLC) (atividade aumentada em pacientes sem medicação) que cliva o fosfolípide de membrana fosfatidil inositol 4,5-difosfato em inositol 3-fosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG). O IP3 se liga em um receptor na membrana do retículo endoplasmático liso e este libera estoque de cálcio intracelular; o DAG e o cálcio ativam proteína quinase C (PKC). O cálcio ainda atua sobre a calmodulina, deslocando a enzima iPLA₂ ligada, ativando-a. A fosfoinosítideo-3-quinase (PI3K) inibe a proteína quinase B (Akt), que também inibe a fosforilação da GSK-3B. O nível de interferon-gama (IFN-γ) aumentado inibe as proteínas *mitogen activated protein kinase* (MAPK) e GSK-3B. Devido à inibição da fosforilação da GSK-3B, sua atividade estará aumentada. Observa-se ainda que o complexo formado pelo *cAMP response element-binding* (CREB) e pelo fator de transcrição *protein activator-1* (AP-1) está inativo, o que ativa a caspase-3, favorecendo a apoptose. Aumento de atividade da GSK-3B causa destruição da β-catenina, contribuindo para a apoptose, o estresse neuronal e a alteração morfológica. Com isto se favorece um quadro inflamatório; observa-se um aumento de interleucina 12 (IL-12) e diminuição de IL-10.

De fato, Crespo-Facorro et al. (2008) observaram um aumento nos níveis de IL-12 em pacientes de primeiro episódio psicótico em relação ao grupo controle, bem como a permanência desse aumento após tratamento por seis semanas com haloperidol, olanzapina ou risperidona, sem diferença entre os grupos. Também foram observados níveis mais baixos de *brain derived neurothrophic factor* (BDNF) em pacientes psicóticos de 1º episódio

(Chen et al., 2009) quando comparados ao grupo controle, evidenciando a presença do quadro inflamatório concomitante com a psicose.

Na Figura 2 é apresentada a provável relação dessas moléculas nos sujeitos controle e nos pacientes com esquizofrenia que recebem tratamento antipsicótico contínuo.

Akt: proteína quinase B; AP-1: *protein activator-1*; BAD: *Bcl-2-associated death promoter*; Bax: *Bcl-2-associated X protein*; Bcl2: *B-cell-lymphoma 2*; BDNF: *brain derived neurothrophic factor*; CREB: *cAMP response elemento-binding*; IFN-γ: *interferon gama*; iPLA₂: fosfolipase A₂ independente de cálcio; IL-10: interleucina 10; IL-6: interleucina 6; IL-1b: interleucina 1b; GSK-3B: glicogênio sintase quinase-3 beta; MAPK: *mithogen activated protein kinase*; p(Ser9)-GSK-3B: glicogênio sintase quinase-3 beta fosforilada; PI3K: fosfo-inositídeo-3-quinase; PKC: proteína quinase C; PLC: fosfolipase C; TLR: *toll like receptor*; TNF-α: fator de necrose tumoral alfa. →: ativação; ---●: inibição.

Fonte: Raposo et al., não publicado

Figura 2. Via *Wnt* em indivíduos saudáveis ou com esquizofrenia em uso de antipsicóticos

Nos sujeitos controle e nos pacientes com esquizofrenia crônicos e em uso prolongado de antipsicóticos pode-se supor que a ligação das proteínas *Wnt* aos receptores *frizzled* ativam as proteínas *dishevelled*. Nesse caso, as *dishevelled* inativam o complexo formado por GSK-3B, axina e *adenomatous polyposis coli* (APC), mantendo a fosforilação da GSK-3B. O TLR4 atua inibindo transitoriamente a fosforilação da GSK-3B. A PI3K ativa a Akt, que também favorece a fosforilação da GSK-3B; ativa também a proteína MAPK, que ativa o CREB/AP-1 e inibe a caspase-3, favorecendo a sobrevivência celular. A ligação das *Wnt* aos receptores *frizzled* ativa a proteína G, que estimula a ação da PLC, resultando em IP3 e DAG. Estes atuam na liberação do cálcio citoplasmático e ativação da PKC, respectivamente. O cálcio desloca a iPLA₂ da calmodulina, ativando-a em níveis fisiológicos. A fosforilação de GSK-3B faz com que sua atividade diminua e se acumule β -catenina. A β -catenina acumulada vai para o núcleo, se liga ao TCF/ LEF e, desta forma, atua na regulação gênica. É observado um aumento de IL-10 e diminuição de citocinas pró-inflamatórias (IL-12, TNF- α , IL-6, IL-1b). Nos pacientes crônicos, em uso contínuo de antipsicóticos, sejam estes de 1ª ou de 2ª geração, verifica-se um aumento da fosforilação da GSK-3B devido à ação do medicamento, contribuindo para o equilíbrio dessa via bioquímica no organismo.

De fato, Gattaz et al. (1987, 1995) observaram que o uso de haloperidol 10 mg/ dia por 3 semanas foi suficiente para que a atividade de PLA₂ atingisse valores próximos aos observados no grupo controle em soro

(Gattaz et al., 1987) e em plaquetas (Gattaz et al., 1995) de pacientes com esquizofrenia.

Smesny et al. (2005) observaram um aumento da atividade de iPLA₂ sorológica (determinada por fluorimetria) em pacientes de 1º episódio psicótico quando comparados a grupo controle pareados por sexo e idade. No entanto, não foram observadas diferenças quando foi avaliada a atividade da iPLA₂ em pacientes crônicos e comparada com um grupo controle, também pareado por sexo e idade. Devido à diferença de idade dos pacientes, foram avaliados dois grupos controles e não foi observada diferença na atividade de iPLA₂ dentre estes.

No córtex pré-frontal de camundongos, Kozlovsky et al. (2006) observaram que a administração prolongada (durante 21 dias) de haloperidol (10 mg/ kg dia, uma vez ao dia, via intraperitoneal) reduziu os níveis de p(Ser9)-GSK-3B, enquanto que a clozapina (25 g/ L, na água, *ad libitum*) aumentou esses níveis. O haloperidol aumentou a atividade de GSK-3B, ação esta contrária à esperada. Alimohamad et al. (2005b) observaram um aumento de β -catenina e de GSK-3B em tecido cerebral de ratos adultos (com idade maior do que 14 semanas) após administração via intramuscular ou subcutânea de risperidona (0,9 mg/ kg), clozapina (25 mg/ kg) ou haloperidol (1,0 mg/ kg) por uma semana. No entanto, essa diferença não foi observada em experimento similar realizado em ratos jovens (com idade entre 8 – 9 semanas). Alimohamad et al. (2005a), em outro estudo, observaram que o tratamento crônico com risperidona (0,9 mg/ kg) ou haloperidol (1,0 mg/ kg), administrados via intramuscular ou sub-cutânea,

aumentou os níveis de β -catenina e de GSK-3B no córtex pré-frontal de ratos. Esses autores também verificaram a ação de antidepressivos, como a fluoxetina, de anticonvulsivantes, como o ácido valproico, e de substâncias psicomiméticas, como a anfetamina, e não foram observadas alterações nos níveis de β -catenina ou de GSK-3B nessa matriz biológica. Essa observação sugere que o aumento dos níveis de β -catenina e de GSK-3B é uma função específica dos antipsicóticos, talvez mediada por antagonismo de receptores D_2 e não por meio de outras alterações no SNC, como sedação, por exemplo.

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que os possíveis biomarcadores periféricos avaliados nos pacientes em tratamento antipsicótico retornam aos níveis observados no grupo de sujeitos controle, reestabelecendo o funcionamento dessas vias bioquímicas. Sendo assim, na fase de manutenção da doença, eles possivelmente sugerem adesão ao tratamento medicamentoso (um dos critérios de inclusão).

Apesar da dificuldade de se estabelecer biomarcadores para a esquizofrenia, recentemente Schwarz et al. (2011) propuseram, pela 1ª vez, uma assinatura bioquímica no soro para pacientes com esquizofrenia. Cento e oitenta e uma proteínas foram analisadas simultaneamente por um ensaio imunológico e 28 analitos foram significativamente diferentes ao se comparar os pacientes com esquizofrenia e os sujeitos controle. Estes autores (Schwarz et al., 2011) avaliaram pacientes no início da doença, os quais não estavam sob uso de medicação, evitando vieses no resultado. No entanto, foi apontada a dificuldade de se conduzir estudos com pacientes de

primeiro episódio e que não estejam sob efeito de medicação, pois mesmo os grandes centros recebem cerca de 20-30 desses pacientes por ano. Embora seja essa a situação desejável, ela não ocorreu nem no presente estudo nem em outros encontrados na literatura (Nadri et al., 2002; Smesny et al., 2005), nos quais foram avaliados pacientes crônicos, já medicados e com comorbidades associadas.

Nesse estudo, devido ao baixo número de pacientes crônicos em tratamento com haloperidol (n= 7, sob a forma farmacêutica de comprimido), foi necessário incluir também os pacientes que fazem uso dessa medicação na forma de decanoato de haloperidol, de liberação prolongada (n= 5) (a dois pacientes o haloperidol era prescrito nas duas formas). Segundo Yang et al. (2005), formulações de depósito são a melhor alternativa para o tratamento de pacientes pouco aderentes. Nesse estudo, os pacientes crônicos tratados com decanoato de haloperidol já haviam usado antipsicóticos de 2ª geração, mas sem sucesso.

As evidências de que não houve diferença para essas enzimas avaliadas no presente trabalho sugere que, para essa via bioquímica, talvez não se tenha diferença significativa entre os antipsicóticos de 1ª e 2ª geração para o tratamento da esquizofrenia. Em virtude da diferença de custos entre esses, devido às patentes de alguns dos antipsicóticos de 2ª geração ainda não terem expirado, estimulam-se os estudos de farmacoeconomia, aliados à experiência clínica, os quais são cada vez mais solicitados pelos gestores de saúde. Esses estudos (de custo-utilidade) requerem longo período de avaliação (pelo menos de 6 meses) das

características clínicas, da qualidade de vida, dos custos e também de seguimento dos respondedores e desistentes da pesquisa (Revicki, 1997).

Nos pacientes avaliados longitudinalmente (GL), ao se inferir a inatividade da GSK-3B não foi observada diferença entre as duas avaliações para os pacientes aos quais foi administrada olanzapina, pois o aumento de GSK-3B tanto do conteúdo total quanto da fosforilação foi compensatório. No entanto, foi observada uma tendência para aumento da atividade de GSK-3B após a administração de haloperidol por 8 semanas. Há relatos na literatura de que o haloperidol aumente os níveis de fosforilação da enzima em tecido cerebral de roedores (Alimohamad et al., 2005a; 2005b). De qualquer forma, estes resultados devem ser analisados com bastante cautela devido ao pequeno tamanho da amostra ($n = 6$) e heterogeneidade da mesma. Além disso, alguns pacientes inicialmente internados e em tratamento medicamentoso abandonaram o uso do medicamento tão logo tiveram a alta médica, o que representa um importante viés nesse estudo.

A diferença de valores entre as dosagens nos pacientes livres de tratamento aos quais foi prescrita a olanzapina ou o haloperidol pode ser explicada pela diferença de tipo de paciente: no 1º grupo (olanzapina), os pacientes já eram diagnosticados com esquizofrenia, enquanto que no 2º grupo (haloperidol), eram pacientes em primeiro surto psicótico e, portanto, com menor duração da doença e sem diagnóstico de certeza. Ainda mais relevante é o fato do tratamento antipsicótico ter sido suspenso nos pacientes do 1º grupo, o que pode ter provocado efeito rebote de

descontinuação, enquanto que os pacientes do 2º grupo ainda não haviam sido tratados com antipsicóticos.

As fracas correlações entre as determinações enzimáticas e psicopatologias encontradas devem ser analisadas com bastante cuidado, pois o tamanho amostral é pequeno e a heterogeneidade dos pacientes é elevada. A correlação negativa e fraca entre atividade de sPLA₂ e pontuação total da PANSS sugere uma possível maior atividade de sPLA₂ nos pacientes com quadros menos graves da esquizofrenia. Os subtipos iPLA₂ e cPLA₂, conforme apresentado na revisão de literatura, estão principalmente envolvidos com distúrbio sináptico e remodelamento de fosfolípidos, enquanto a sPLA₂ (especialmente por se tratar de uma medida periférica, plaquetária) está envolvida principalmente com a resposta celular homeostática. Um aspecto falho nessa correlação é que os subtipos iPLA₂ e/ ou cPLA₂, por outro lado, não estão correlacionados a um aumento da PANSS total, o que tornaria mais plausível a suposição de maior atividade enzimática estar relacionada com maior gravidade de sintomas.

A correlação positiva e moderada entre fosforilação de GSK-3B e sintomas negativos da PANSS pode ser analisada incluindo outros resultados e na tentativa de se estabelecer uma relação com a hipótese dopaminérgica da esquizofrenia (Howes; Kapur, 2009). Os pacientes avaliados longitudinalmente, aos quais foi prescrita a olanzapina, apresentaram um aumento da atividade dos subtipos de PLA₂ avaliados e uma diminuição dos níveis de GSK-3B. Gattaz e Brunner (1996) demonstraram, em dois modelos animais, que uma aplicação intracerebral

de PLA₂ inibe a atividade dopaminérgica no córtex pré-frontal. Por outro lado, na literatura os sintomas negativos estão tipicamente associados com hipofunção dopaminérgica frontal. Sendo assim, e de acordo com a correlação observada, é plausível supor que um paciente que apresente predomínio de sintomas negativos apresente também uma atividade reduzida de GSK-3B (aumento de fosforilação em Ser9) em grande medida atribuível ao efeito de bloqueio dopaminérgico mediado pelos antipsicóticos. Por outro lado, não foram verificadas correlações significativas entre nível de atividade de GSK-3B e pontuações de sintomas positivos.

Importantes limitações desse estudo devem ser destacadas: o pequeno número de pacientes em cada grupo, aliado à alta heterogeneidade destes; polifarmácia (exceto de antipsicóticos) nos pacientes do braço transversal; a não realização da PANSS ao final das 8 semanas de tratamento medicamentoso no braço longitudinal aos quais foi prescrito o haloperidol; a não recuperação dos valores individuais das PANSS dos pacientes do braço longitudinal aos quais foi prescrita a olanzapina.

Em um período de 8 semanas, a modulação das enzimas avaliadas foi observada somente para os pacientes inicialmente livres de tratamento medicamentoso e aos quais posteriormente foi administrada a olanzapina. Embora o resultado tenha sido favorável para um antipsicótico de 2ª geração, deve-se ressaltar a necessidade do tratamento prolongado para a esquizofrenia, visto ser esta uma doença crônica. Nesse sentido, os resultados dos estudos CATIE e CUTLASS, de maior duração, maior

casuística, randomizados e cegos (situação desejável), demonstram a necessidade de se verificar de maneira mais criteriosa a suposta superioridade dos antipsicóticos de 2ª geração. Adicionalmente, embora não se tenha obtido diferença estatisticamente significativa de uma possível modulação enzimática propiciada também pelo haloperidol, é possível que o modesto número de indivíduos analisados não tenha sido suficiente para a demonstração do efeito.

Além dos efeitos metabólicos associados aos antipsicóticos de 2ª geração, eles também possuem custo elevado, especialmente no Brasil, onde necessitam de critérios administrativos de dispensação. No SUS, os antipsicóticos de 2ª geração (clozapina, olanzapina, risperidona, quetiapina e ziprasidona) são disponibilizados pelo Programa de Medicamentos Excepcionais do Ministério da Saúde (Brasil, 2002). Esse programa, de abrangência nacional, é responsável pelo fornecimento de medicamentos considerados de alto custo, geralmente de uso contínuo, utilizados em tratamento ambulatorial no tratamento de doenças crônicas. Em relação aos antipsicóticos, estes estão destinados aos pacientes que não responderam ou não toleraram o tratamento com os antipsicóticos de 1ª geração. Embora tais medicamentos estejam disponíveis em todo o território nacional, há entraves para a prescrição destes em centros menores. A clozapina, por exemplo, requer constante (semanal, inicialmente) monitorização terapêutica (hemograma, devido ao risco de agranulocitose). Sabe-se que em locais com menor infraestrutura o tempo para a liberação do resultado é incompatível para o controle médico da potencial discrasia sanguínea.

Nesse estudo, foi demonstrado, pela primeira vez na literatura, um aumento na fosforilação de GSK-3B por um antipsicótico em humanos. Esse efeito foi verificado quando analisados somente os pacientes inicialmente livres de tratamento medicamentoso e aos quais foi prescrita a olanzapina. A olanzapina é um antipsicótico que antagoniza receptores 5-HT_{2A} com afinidade elevada (Wurch et al., 2003). Anormalidades nos receptores 5-HT_{2A} são evidentes no cérebro de pacientes com esquizofrenia; além disso, agonistas dos receptores 5-HT_{2A}, como dietilamida do ácido lisérgico e psilocibina, mimetizam estados psicóticos semelhantes à esquizofrenia (Geyer; Vollenweider, 2008). Li et al. (2004) foram os primeiros autores a demonstrarem que a atividade serotoninérgica regulava a fosforilação de GSK-3B no tecido cerebral *in vivo* de camundongos. O resultado encontrado nas plaquetas está de acordo com os achados de Alimohamad et al. (2005a; 2005b), os quais observaram que diferentes antipsicóticos aumentaram a fosforilação de GSK-3B, bem como os níveis de GSK-3Bt no tecido cerebral de roedores. Li et al. (2007) observaram um aumento de p(Ser9)-GSK-3B quando a olanzapina ou outros antipsicóticos de 2ª geração foram administrados em dose única a camundongos. No entanto, o haloperidol não aumentou os níveis de p(Ser9)-GSK-3B, o que reforça a suposição de que o antagonismo do receptor 5-HT_{2A} é um possível mecanismo para a ação da olanzapina. Talvez a efetividade da olanzapina seja devido à dessensibilização dos receptores 5-HT_{2A}, que estimula a fosfolipase C (Muma et al., 2007; Singh et al., 2010), o que pode levar ao aumento de fosforilação da GSK-3B (Polter; Li, 2011). Uma suposição é que

a dessensibilização ocorra devido a uma mudança na interação entre a serotonina e os receptores 5-HT_{2A}, ou por um decréscimo na capacidade dos receptores 5-HT_{2A} de ativarem a proteína G_{αq/11} (Muma et al., 2007). Kozlovsky et al. (2006) reportaram que a clozapina aumentou os níveis de p(Ser9)-GSK-3B no tecido cerebral de camundongo. Por outro lado, no mesmo estudo, Kozlovsky et al. (2006) observaram que o haloperidol diminuiu o nível de GSK-3Bt. No entanto, Roh et al. (2007) verificaram que o tratamento agudo em ratos tanto com a clozapina quanto com o haloperidol aumentou o nível de p(Ser9)-GSK-3B no córtex frontal.

Nesse estudo, não foram observadas diferenças na razão de GSK-3B entre os controles e os pacientes, nem no momento inicial nem após a administração de olanzapina. Esse resultado sugere que a redução de GSK-3B na esquizofrenia é primeiramente relacionada à redução na expressão dessa enzima, seguida do decréscimo da porcentagem de fosforilação.

As plaquetas podem ser consideradas um modelo periférico dos neurônios, pois essas células compartilham funções, como a síntese e liberação de neurotransmissores, e a expressão de receptores de membrana (Bush; Tanzi, 1998). As plaquetas expressam somente receptores 5-HT_{2A}, enquanto o tecido cerebral expressa todos os tipos. A regulação de GSK-3B envolve principalmente os receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A}. Li et al. (2004) observaram que vários moduladores serotoninérgicos regularam a atividade da GSK-3B no tecido cerebral de camundongo, no qual o nível de p(Ser9)-GSK-3B aumentou devido à liberação endógena de

serotonina, ativação do receptor 5-HT_{1A} e bloqueio do receptor 5-HT_{2A}. Como a olanzapina age predominantemente nos receptores 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C} (Bymaster et al., 1999), as plaquetas podem ser consideradas um modelo periférico adequado para estudar os efeitos da olanzapina na fosforilação da GSK-3B. Se for considerado que a regulação da GSK-3B depende de mecanismos sistêmicos que também influenciam as funções do SNC, essas suposições talvez indiquem como a olanzapina atua no tecido cerebral de pacientes com esquizofrenia.

A condução de estudos longitudinais, de longa duração, com pacientes inicialmente livres de antipsicóticos e também de outros fármacos, contribuiriam para um maior entendimento sobre a ação de cada antipsicótico. À medida que fossem obtidas medidas bioquímicas, genéticas, clínicas e neuropsicológicas, desde a manifestação da doença até a sua cronicidade, alguns aspectos sobre a fisiopatologia e racionalização da terapia medicamentosa da esquizofrenia poderiam ser esclarecidos.

7 CONCLUSÕES

A esquizofrenia está associada com aumento de atividade de fosfolipase A_2 e diminuição do nível de GSK-3B em plaquetas;

A administração de olanzapina por 8 semanas diminuiu a atividade de PLA_2 e aumentou o nível de GSK-3B; o efeito do haloperidol sobre a PLA_2 e a GSK-3B foi considerado inconsistente devido ao pequeno tamanho amostral. Essas medidas serão realizadas em uma casuística maior;

A administração de clozapina, olanzapina em regime de monoterapia ou associado com a risperidona, ou haloperidol em regime de monoterapia ou associado com outro antipsicótico de 1ª geração por um período superior a 6 meses a pacientes com esquizofrenia fez com que a atividade de subtipos de PLA_2 e os níveis de GSK-3B apresentassem valores próximos aos de um grupo controle;

Nos pacientes com esquizofrenia medicados a pelo menos seis meses com clozapina, olanzapina ou haloperidol os níveis de p(Ser9)-GSK-3B se correlacionam de maneira positiva e moderada com a pontuação da sub-escala da síndrome negativa da PANSS;

Os resultados obtidos sugerem que os possíveis biomarcadores periféricos avaliados nessa pesquisa retornam aos níveis observados no grupo de sujeitos controles com o tratamento antipsicótico, reestabelecendo o funcionamento dessas vias bioquímicas. Sendo assim, na fase de manutenção da doença, eles podem possivelmente sugerir aderência ao tratamento medicamentoso (um dos critérios de inclusão).

ANEXO – Fluxograma do recrutamento dos pacientes crônicos medicados
em uso de haloperidol

AP: antipsicótico; HA: haloperidol; im: intramuscular; vo: via oral.

AP: antipsicótico; HA: haloperidol; im: intramuscular; vo: via oral.

8 REFERÊNCIAS

- Abe A, Shayman JA. Purification and characterization of 1-Oacylceramide synthase, a novel phospholipase A₂ with transacylase activity. *J Biol Chem*. 1998; 273: 8467-74.
- Abibhatla RM, Hatcher JF. Altered lipid metabolism in brain injury and disorders. *Subcell Biochem*. 2008; 49: 241-68.
- Ackermann EJ, Dennis EA. Mammalian calcium-independent phospholipase A₂. *Biochim Biophys Acta*. 1995; 1259: 125-36.
- Adams C, Wilson P, Gilbody S, Bagnall AM, Lewis. Drug treatment for schizophrenia. *Qual Health Care*. 2000; 9: 73-9.
- Akiba S, Sato, T. Cellular function of calcium-independent phospholipase A₂. *Biol Pharm.Bull*. 2004; 27: 1174-8.
- Alimohamad H, Rajakumar N, Seah Y, Rushlow W. Antipsychotics alter the protein expression levels of β -catenin and GSK-3 in the rat medial prefrontal cortex and striatum. *Biol. Psychiatry* 2005a; 57: 533-42.
- Alimohamad H, Sutton L, Mouyal J, Rajakumar N, Rushlow WJ. The effects of antipsychotics on β -catenin, glycogen synthase kinase-3 and disheveled in the ventral midbrain of rats. *J Neurochem*. 2005b; 95: 513-25.
- American Psychiatry Association. *DSM-IV-TRTM – Manual Diagnóstico Estatístico de Transtornos Mentais*. 4ª Ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 2002. p. 303-43.
- Bakhtiar R. Biomarkers in drug discovery and development. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2008; 57: 85-91.
- Balboa MA, Saez Y, Balsinde J. Calcium-independent phospholipase A₂ is required for lysozyme secretion in U937 promonocytes. *J Immunol*. 2003; 170: 5276-80.
- Baldessarini RJ, Tarazi FI. Tratamento farmacológico da psicose e da mania. In: Brunton LL, Lazo JS, Parker KL. *Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. 11ª ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill/ Artmed, 2007. p.411-66.
- Balsinde J, Bianco ID, Ackermann EJ, Conde-Frieboes K, Dennis EA. Inhibition of calcium-independent phospholipase A₂ prevents arachidonic acid incorporation and phospholipid remodeling in P388D1 macrophages. *Proc Natl. Acad Sci USA*. 1995; 92: 8527-31.

- Balsinde J, Dennis EA. Distinct roles in signal transduction for each of the phospholipase A₂ enzymes present in P388D1 macrophages. *J Biol Chem*. 1996; 271: 6758-65.
- Balsinde S, Balboa MA, Insel PA. Regulation and inhibition of phospholipase A₂. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1999; 39: 175-89.
- Bazan NG, Zorumski CF, Clark GD. The activation of phospholipase A₂ and release of arachidonic acid and other lipid mediators at the synapse: the role of platelet-activating factor. *J Lipid Mediat*. 1993; 6: 421-7.
- Bazan NG. The neuromessenger platelet-activating factor in plasticity and neurodegeneration. *Prog Brain Res*. 1998; 118 : 281-91.
- Bazan NG, Tu B, Rodriguez de Turko EB. What synaptic lipid signaling tells us about seizure-induced damage and epileptogenesis. *Prog Brain Res*; 2002; 135:175-85.
- Beasley C, Cotter D, Khan N, Pollard C, Sheppard P, Varndell I, Lovestone S, Anderton B, Everall I. Glycogen synthase kinase-3 β immunoreactivity is reduced in the prefrontal cortex in schizophrenia. *Neuroscience Letters*. 2001; 302: 117-20.
- Beasley C, Cotter D, Everall I. An investigation of the Wnt-signalling pathway in the prefrontal cortex in schizophrenia, bipolar disorder and major depressive disorder. *Schizophr Res*. 2002; 58: 63-7.
- Beck EM, Cavetti M, Wirtz M, Kossowsky J, Vauth R. How do socio-demographic and clinical factors interact with adherence attitude profiles in schizophrenia? A cluster-analytical approach. *Psychiatry Res*. 2011; 187:55-61.
- Benedetti F, Poletti S, Radaelli D, Bernasconi A, Cavallaro R, Falini A, Lorenzi C, Pirovano A, Dall'aspezia S, Locatelli C, Scotti G, Smeraldi E. Temporal lobe grey matter volume in schizophrenia is associated with genetic polymorphism influencing glycogen synthase kinase-3 β activity. *Genes Brain Behav*. 2010; 9: 365-71.
- Bennett CN, Horrobin DF. Gene targets related to phospholipids and fatty acid metabolism in schizophrenia and other psychiatric disorders: an update. *Prostaglandins, Leukot and Essent Fatty Acids*. 2000; 63: 47-59.
- Berg L. Impediments to research progress in development of behavioural approaches to treatment and care of persons with Alzheimer's disease. *Int Psychogeriatr*. 1996; 1: 113-4.

- Bhanot B, Brink M, Samos CH, Hsieh J, Wang Y, Macke JP, Andrew D, Nathans J, Nusse R. A new member of the *frizzled* family from *Drosophila* functions as a Wingless receptor. *Nature*. 1996; 382: 225-30.
- Bitanhirwe BKY, Woo, TW. Oxidative stress in schizophrenia: an integrated approach. *Neurosci Biobehav Res*. 2011; 35: 878-93.
- Blusztajn JK, Liscovitch M, Richardson UI. Synthesis of acetylcholine from choline derived from phosphatidylcholine in a human neuronal cell line. *Proc Natl Acad Sci*. 1987; 84: 5474-7.
- du Bois TM, Deng C, Huang X. Membrane phospholipid composition, alterations in neurotransmitter systems and schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2005; 29: 878-88.
- Brasil. Ministério da Saúde. Portaria MS/GM n.º 1318, de 23 de julho de 2002. Inclui os medicamentos na tabela de medicamentos excepcionais. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*. Brasília, 2002.
- Brown JD, Moon RT. Wnt signaling: why is everything so negative? *Curr Opin Cell Biol*. 1998; 10: 182-7.
- Buckley PF. Treatment of schizophrenia: let's talk dollars and sense. *Am J Man Care*. 1998; 4: 369-83.
- Burke JE, Dennis EA. Phospholipase A₂ biochemistry. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2009; 23: 49-59.
- Bush AI, Tanzi RE. Alzheimer disease-related abnormalities of amyloid β precursor protein isoforms in the platelet. *Arch Neurol*. 1998; 55: 1179-80.
- Bymaster F, Perry KW, Nelson DL, Wong DT, Rasmussen K, Moore NA, Calligaro DO. Olanzapine: a basic science update. *Br J Psychiatry Suppl*. 1999; 37: 36-40.
- Castelo-Branco G, Wagner J, Rodriguez FJ, Kele J, Sousa K, Rawal N, Pasolli HA, Fuchs E, Kitajewski J, Arenas E. Differential regulation of midbrain dopaminergic neuron development by Wnt-1, Wnt-3a, and Wnt-5a. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100: 12747-52.
- Clark JD, Lin LL, Kriz RW. A novel arachidonic acid-selective cytosolic PLA₂ contains a Ca²⁺-dependent translocation domain with homology to PKC and GAP *Cell*. 1991; 65: 1043-51.
- Chaves AC. *Diferenças entre os sexos na evolução da Esquizofrenia* [tese]. São Paulo: Escola Paulista de Medicina, 1994.

- Chaves, AC, Shirakawa I. Escalas das síndromes negativa e positiva e seu uso no Brasil. In: Gorenstein C, Andrade LH, Zuardi AW. *Escalas de avaliação clínica em psiquiatria e psicofarmacologia*. São Paulo: Lemos, 2000.
- Chen C, Wang J, Wang B, Yang SC, Zhang CX, Zheng YL, Li YL, Wang N, Yang KB, Xiu MH, Kosten TR, Zhang XY. Decreased levels of serum brain-derived neurotrophic factor in drug-naïve first-episode schizophrenia: relationship to clinical phenotypes. *Psychopharmacology (Berl)*. 2009; 207: 375-80.
- Ciani L, Salinas PC. c-Jun N-terminal (JNK) cooperates with GSK3B to regulate dishevelled-mediated microtubule stability. *BMC Cell Biol*. 2007; 8: 27-40.
- Correll CU, Schenk EM. Tardive dyskinesia and new antipsychotics. *Curr Opin Psychiatry*. 2008; 21: 151-6.
- Crespo-Facorro B, Carrasco-Marín E, Pérez-Iglesias R, Pelavo-Terán JM, Fernandez-Prieto L, Leyva-Cobián F, Vásquez-Barquero JL. Interleukin-12 plasma levels in drug-naïve patients with a first episode of psychosis: effects of antipsychotic drug. *Psychiatry Res*. 2008; 158: 206-16.
- Daltio CS, Mari JJ, Ferraz MB. Estudos farmacoeconômicos e carga da doença em esquizofrenia. *Rev Psiq Clin*. 2007; 34: 208-12.
- Deicken RF, Fein G, Weiner MW. Abnormal frontal lobe phosphorous metabolism in bipolar disorder. *Am J Psychiatry*. 1995; 152: 915-8.
- Dennis EA. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A₂. *J Biol Chem*. 1994; 269: 13057-60.
- Dennis EA, Burke JE. Phospholipase A₂ structure/function, mechanism, and signaling. *J Lipid Res*. 2009; 50: S237-42.
- Diniz BS, Talib LL, Joaquim HPG, de Paulo VRJ, Gattaz WF, Forlenza OV. Platelet GSK3B activity in patients with late-life depression: marker of depressive episode severity and cognitive impairment? *World J Biol Psychiatry*. 2011; 12: 216-22.
- Dixon L, Perkins D, Calmes C. *Guideline watch* (September 2009): Practice guideline for the treatment of patients with schizophrenia. Arlington, VA: APA, 2009.
- Duncan RE, Nagy-Sarkadi E, Jaworski K, Ahmadian M, Sul HS. Identification and Functional Characterization of adipose-specific phospholipase A₂ (AdPLA₂). *J Biol Chem*. 2008; 283: 25428-36.

- Durany N, Thome J. Neurotrophic factors and the pathophysiology of schizophrenic psychoses. *Eur Psychiatr*. 2004; 19: 326-37.
- Emamian ES, Hall D, Birnbaum MJ, Karayiorgou M, Gogos JA. Convergent evidence for impaired AKT-1-GSK-3B signaling in schizophrenia. *Nat Genet*. 2004; 36: 131-7.
- Expert Consensus Treatment Guidelines for Schizophrenia: a guide for patients and families. *J Clin Psychiatry*. 1999; 60: 1-8.
- Farooqui AA, Horrocks LA. Involvement of glutamate receptors, lipases, and phospholipases in long-term potentiation and neurodegeneration. *J Neurosci Res*. 1994; 36: 267-323.
- Farooqui AA, Yang HC, Rosenberger TA, Horrocks LA. Phospholipase A₂ and its role in brain tissue. *J Neurochem*. 1996; 69: 889-901.
- Farooqui AA, Horrocks L A, Farooqui T. Glycerophospholipids in brain: Their metabolism, incorporation into membranes, functions, and involvement in neurological disorders. *Chem Phys Lipids*. 2000a; 106: 1 - 29.
- Farooqui AA, Horrocks LA, Farooqui T. Deacylation and reacylation of neuronal membrane glycephospholipids: A matter of life and death. *J Mol Neurosci*. 2000b; 14: 123 - 135.
- Farooqui AA, Horrocks LA. Brain phospholipases A₂: A perspective on the history. *Prostaglandins, Leukot and Essent Fatty Acids*. 2004; 71: 161-69.
- Farooqui AA, Ong W, Horrocks LA. Biochemical Aspects of Neurodegenerations in Human Brain: Involvement of Neural Membrane Phospholipids and Phospholipases A₂. *Neurochemical Research*. 2004; 29: 1961-77.
- Farooquil AA, Ong W, Horrocks LA. Inhibitors of Brain Phospholipase A₂ Activity: Their Neuropharmacological Effects and Therapeutic Importance for the Treatment of Neurologic Disorders. *Pharmacol Rev*. 2006; 58: 591 - 620.
- Fatemi SH, Folsom TD. The neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia, revisited. *Schizophr Bull*. 2009; 35: 528-48.
- Feuerstein GZ. Platelet-activating factor: a case for its role in CNS function and brain injury. *J Lipid Mediat Cell Signal*. 1996;14: 109-14.

- First, Michael B., Spitzer, Robert L, Gibbon Miriam, and Williams, Janet B.W. *Structured Clinical Interview for DSM-IV-TR Axis I Disorders, Research Version, Patient Edition With Psychotic Screen (SCID-I/P W/ PSY SCREEN)*. New York: Biometrics Research, New York State Psychiatric Institute, November 2002a.
- First, Michael B., Spitzer, Robert L, Gibbon Miriam, and Williams, Janet B.W. *Structured Clinical Interview for DSM-IV-TR Axis I Disorders, Research Version, Non-patient Edition. (SCID-I/NP)*. New York: Biometrics Research, New York State Psychiatric Institute, November 2002b.
- Fleckenstein AE, Volz TJ, Riddle EL, Gibb JW, Hanson GR. New insights into the mechanism of action of amphetamines. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*. 2007; 47: 681-98.
- Flesch I, Schmidt B, Ferber E. Acyl chain specificity and kinetic properties of phospholipase A₁ and A₂ of bone E marrow-derived macrophages. *Z Naturforsch [C]*. 1985; 40: 356–63.
- Forlenza OV, Torres CA, Talib LL, de Paula VJ, Joaquim HPG, Diniz BS, Gattaz WF. Increased platelet GSK3B activity in patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *J Psychiat Res*. 2011; 45: 220-4.
- Frame S, Cohen P. GSK3 takes center stage more than 20 years after its discovery. *Biochem J*. 2001; 359: 1-19.
- Frank R, Hargreaves R. Clinical biomarkers in drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov*. 2003; 2: 566-80.
- Fuentealba P, Crochet S, Timofeey I, Steriade M. Synaptic interactions between thalamic and cortical inputs onto cortical neurons *in vivo*. *J Neurophysiol*. 2004; 91:1990-8.
- Gattaz WF, Kollisch M, Nevalainen TJ, Thuren T, Kinnunen PKJ. Increased plasma phospholipase-A₂ activity in schizophrenia: reduction after neuroleptic therapy. *Biol Psychiatry*. 1987; 22: 421-6.
- Gattaz WF, Hubner CK, Nevalainen TJ, Thuren T, Kinnunen PKJ Increased serum phospholipase-A₂ activity in schizophrenia: a replication study. *Biol Psychiatry*. 1990; 28: 495 - 501.
- Gattaz WF, Schmitt A, Maras AM. Increased platelet phospholipase A₂ activity in schizophrenia. *Schizophr Res*. 1995; 16: 1-6.
- Gattaz WF, Brunner J. Phospholipase A₂ and the hypofrontality hypothesis of schizophrenia. *Prostaglandins Leuko Essent fatty Acids*. 1996; 55 (1-2): 109 - 13.

- Gattaz WF, Cairns NJ, Levy R, Förstl H, Braus DF, Maras A. Decreased phospholipase A₂ activity in the brain and in platelets of patients with Alzheimer disease. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 1996; 246: 129-31.
- Gattaz WF, Valente KD, Raposo NRB, Vincentiis S, Talib LL. Increased PLA₂ activity in the hippocampus of patients with temporal lobe epilepsy and psychosis. *J Psychiatr Res*. 2011; 45: 1617-20.
- Geddes J, Freemantle N, Harrison P, Bebbington P. Atypical antipsychotics in the treatment of schizophrenia: systematic overview and meta-regression analysis. *BMJ*. 2000; 321: 1371-6.
- Geddis MS, Tornieri K, Giesecke A, Rehder V. PLA₂ and secondary metabolites of arachidonic acid control filopodial behavior in neuronal growth cones. *Cell Motil Cytoskeleton*. 2004; 57: 53-67.
- Genc K, Genc S. Oxidative stress and dysregulated Nrf2 activation in the pathogenesis of schizophrenia. *Bioscience Hypothesis*. 2009; 2: 16-8.
- Geyer MA, Vollenweider FX. Serotonin research: contributions to understanding psychoses. *Trends in Pharmacol Sci*. 2008; 29: 445-453.
- Glen AI, Glen EM, Horrobin DF, Vaddadi KS, Spellman M, Morse-Fisher N, Ellis K, Skinner FS. A red cell membrane abnormality in a subgroup of schizophrenic patients: evidence for two diseases. *Schizophr Res*. 1994; 12: 53-61.
- Grimes CA, Jope RS. The multifaced roles of glycogen synthase kinase 3 β in cellular signaling. *Prog Neurobio*. 2001; 65: 391-426.
- Grove EA, Tole S, Limon J, Yip L, Ragsdale CW. The hem of the embryonic cerebral cortex is defined by the expression of multiple Wnt genes and is compromised in Gli3-deficient mice. *Development*. 1998; 125:2315-25.
- Hansen K, Lançon C, Toumi M. Pharmacoeconomic modeling in schizophrenia: trap or support for decision makers? *Eur J Health Econom*. 2006; 7: 719-29.
- Hastings TG. Enzymatic oxidation of dopamine: the role of prostaglandin H synthase. *J. Neurochem*. 1995; 64: 919-24.
- Hibbeln JR, Palmer JW, Davis JM. Are disturbances in lipid-protein interactions by phospholipase A₂ a predisposing factor in affective illness. *Biol Psychiatry*. 1999; 25: 945-61.
- Horrobin DF, Manku MS. *Clinical biochemistry of essential fatty acids*. In: Horrobin DF, ed. Omega-6 essential fatty acids, pathophysiology and roles in clinical medicine. New York: Wiley-Liss, 1990: 21-53.

- Horrobin DF, Mankus MS, Hilman H, Lain A, Glen M. Fatty acid levels in the brain of schizophrenics and normal controls. *Biol Psychiatry*. 1991; 30: 795-830.
- Horrobin DF. Nutritional and medical importance of gamma-linolenic acid. *Prog Lipid Res*. 1992; 31:163-94.
- Horrobin DF, Glen AIM, Vaddadi K. The membrane hypothesis of schizophrenia. *Schizophr Res*. 1994; 13: 195-207.
- Horrobin DF. The membrane phospholipid hypothesis as a biochemical basis for the neurodevelopmental concept of schizophrenia. *Schizophr Res*. 1998a; 30: 193-208.
- Horrobin DF. Schizophrenia: the illness that made us human. *Med Hypotheses*. 1998b; 50: 269-88.
- Horrobin DF, Bennett CN. New gene targets related to schizophrenia and other psychiatric disorders: enzymes, binding proteins and transport proteins involved in phospholipid and fatty acid metabolism. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 1999; 60: 141-67.
- Howes OD, Kapur S. The dopamine hypothesis of schizophrenia: version III – the final common pathway. *Schizophr Bull*. 2009; 35: 549-62.
- Huber O, Korn R, McLaughlin J, Ohsugi M, Herrmann BG, Kemler R. Nuclear localization of β -catenin by interaction with transcription factor LEF-1. *Mech Dev*. 1996; 59: 3-10.
- Hur E, Zhou F. GSK3 signaling in neural development. *Nat Rev Neurosci*. 2010; 11: 539-51.
- Ikeda S, Kishida S, Yamamoto H, Murai H, Koyama S, Kikuchi A. Axin, a negative regulator of the Wnt signaling pathway, forms a complex with GSK-3 β and β -catenin and promotes GSK-3 β dependent phosphorylation of β -catenin. *EMBO J*. 1998; 17: 1371-84.
- Ishizaki J, Hanasaki K, Higashino K, Kishino J, Kikuchi N, Ohara O, Arita H. Molecular cloning of pancreatic group I phospholipase A₂ receptor. *J Biochem*. 1994; 269: 5897-904.
- Jardim LSA. *Efeitos da atividade da fosfolipase A₂ nos receptores dopaminérgicos: implicações para a esquizofrenia*. [tese de doutorado]. São Paulo, SP: Universidade de São Paulo. 2005.
- Jindal RD, Keshavan MS. Classifying antipsychotic agents: need for new terminology. *CNS Drugs*. 2008; 22: 1047-59.

- Jones CR, Arai T, Bell JM, Rapoport SI. Preferential in vivo incorporation of [3H] arachidonic acid from blood in rat brain synaptosomal fractions before and after cholinergic stimulation. *J Neurochem.* 1996; 67: 822-9.
- Jones PB, Barnes TRE, Davies L, Dunn G, Lloyd H, Hayhurst KP, Murray RM, Markwick A, Lewis SW. Randomized controlled trial of the effect on quality of life of second-vs first generation antipsychotic drugs in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry.* 2006; 63: 1079-87.
- Junqueira R, Cordeiro Q, Meira-Lima I, Gattaz WF, Vallada H. Allelic association analysis of phospholipase A₂ genes with schizophrenia. *Psychiatr Genet.* 2004; 14 (3): 157-60.
- Kaneez FS, Saeed SA. Investigating GABA and its function in platelets as compared to neurons. *Platelets.* 2009; 20: 328-33.
- Kapur S, Mamo D. Half a century of antipsychotics and still a central role for dopamine D2 receptors. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2003; 27 (7): 1081-90.
- Kay SR, Fiszbein A, Opler LA. The positive and negative syndrome scale for schizophrenia. *Schizophr Bull.* 1987; 13: 261-76.
- Kay SR, Opler LA, Lindenmayer JP. The Positive and Negative Syndrome Scale (PANSS): Rationale and Standardisation. *Br J Psychiatry.* 1989; 155: 59-65.
- Kim H, Choo H, Cho YS, Koh HY, No KT, Pae AN. Classification of dopamine, serotonin, and dual antagonists by decision trees. *Bioorg Med Chem.* 2006; 2763-70.
- Kim YT, Hur EM, Snider WD, Zhou FQ. Role of GSK3 signaling in neuronal morphogenesis. *Front Mol Neurosci.* 2011; 4: 48.
- Kozlovsky N, Belmaker RH, Agam G. Low GSK-3beta immunoreactivity in *postmortem* frontal cortex of schizophrenic patients *Am J Psychiatry.* 2000; 157: 831-3.
- Kozlovsky N, Belmaker RH, Agam G. Low GSK-3 activity in frontal cortex of schizophrenic patients. *Schizophr Res.* 2001; 52: 101-105.
- Kozlovsky N, Belmaker RH, Agam G. GSK-3 and the neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2002; 12: 13-25.
- Kozlovsky N, Nadri C, Belmaker RH, Agam G. Lack of effect of mood stabilizers of neuroleptics on GSK-3B protein levels and GSK-3 activity. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2003; 6: 117-20.

- Kozlovsky N, Regenold WT, Levine J, Rapoport A, Belmaker RH, Agam G. GSK-3 β in cerebrospinal fluid of schizophrenia patients. *J Neural Transm.* 2004a; 111: 1093-8.
- Kozlovsky N, Shanon-Weickert C, Tomaskovic-Crook E, Kleinman JE, Belmaker RH, Agam G. Reduced GSK-3 β mRNA levels in *postmortem* dorsolateral prefrontal cortex of schizophrenic patients. *J Neural Transm.* 2004b; 111: 1583-92.
- Kozlovsky N, Nadri C, Agam G. Low GSK-3 β in schizophrenia as a consequence of neurodevelopmental insult. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2005; 15: 1-11.
- Kozlovsky N, Amar S, Belmaker RH, Agam G. Psychotropic drugs affect Ser9-phosphorylated GSK-3 β protein in rodent frontal cortex. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2006; 9: 337-42.
- Kramer RM, Sharp JD. Structure, function and regulation of Ca²⁺-sensitive cytosolic phospholipase A₂ (cPLA₂). *FEBS Lett.* 1997; 410: 49-53.
- Kuwata H, Nakatani Y, Murakami M, Kudo I. Cytosolic phospholipase A₂ is required for cytokine-induced expression of type IIA secretory phospholipase A₂ that mediates optimal cyclooxygenase-2-dependent delayed prostaglandin E₂ generation in rat 3Y1 fibroblasts. *J Biol Chem.* 1998; 273: 1733-40.
- Laborit H, Huguenard P. L' hibernation artificielle par moyen pharmacodynamiques et physiques. *Presse Med.* 1951; 59: 1329.
- Lambeau GA, Gelb MH. Biochemistry and physiology of mammalian secreted phospholipase A₂. *Annu Rev Biochem.* 2008; 77: 495-520.
- van Leeuwen F, Samos CH, Nusse R. Biological activity of soluble wingless protein in cultured *Drosophila* imaginal discs cells. *Nature.* 1994; 368; 342-4.
- Lehman AF, Lieberman JA, Dixon LB, McGlashan TH, Miller AL, Perkins DO, Kreyenbuhl J. Practice guideline for the treatment of patients with schizophrenia. 2nd edition. *Am J Psychiatry.* 2004; 161:1-56.
- Leitão RJ, Ferraz MB, Chaves AC, Mari J. Cost of schizophrenia: direct costs and use of resources in the State of São Paulo. *Rev Saude Publica.* 2006; 40: 304-9.
- de Leon J. The effect of atypical versus typical antipsychotics on tardive dyskinesia: a naturalistic study. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 2007; 257: 169-72.

- Leucht S, Barnes TRE, Kissling W, Engel RR, Correll C, Kane JM. Relapse prevention in schizophrenia with new-generation antipsychotics: a systematic review and exploratory meta-analysis of randomized, controlled trials. *Am J Psychiatry*. 2003; 160: 1209-22.
- Leucht S, Kane JM, Kissling W, Hamann J, Etschel E, Engel RR. What does the PANSS mean? *Schizophr Res*. 2005; 79: 231-8.
- Li X, Zhu W, Friedman AB, Rosbororough K, Jope RS. In vivo regulation of glycogen synthase kinase-3 β (GSK3 β) by serotonergic activity in mouse brain. *Neuropsychopharmacology*. 2004; 29: 1426-31.
- Li X, Rosborough KM, Friedman AB, Zhu W, Roth KA. Regulation of mouse brain glycogen synthase kinase-3 by atypical antipsychotics. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2007; 10: 7-19.
- Lidner, LM. *Estudo de custo-utilidade dos antipsicóticos haloperidol, risperidona e olanzapina para o tratamento da esquizofrenia sob a perspectiva do Sistema Único de Saúde em Santa Catarina, 2006* [dissertação]. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2007.
- Lieberman JA, Stroup TS, McEvoy JP, Swartz MS, Rosenheck RA, Perkins DO, Keefe RSE, Davis SM, Davis CE, Lebowitz BD, Severe J, Hsiao JK. Effectiveness of antipsychotic drugs in patients with chronic Schizophrenia. *N Engl J Med*. 2005; 353:1209 –23.
- Lovestone S, Killick R, Di Forti M, Murray R. Schizophrenia as a GSK-3 dysregulation disorder. *Trends Neurosci*. 2007; 30: 142-9.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J Biol Chem*. 1951; 193: 265-75.
- Manguikian DA, Barbour SE, Cell cycle dependence of group VIA calcium-independent phospholipase A₂ activity. *J Biol Chem*. 2004; 279: 52881-92.
- Marcus AJ, Ultman HL, Safier LB. Lipid composition of subcellular particles of human blood platelets. *J Lipid Res*. 1969; 10: 108-14.
- Martínez-Gras I, Pérez-Nievas BG, García-Bueno B, Madrigal JLM, Andrés-Esteban E, Rodríguez-Jiménez R, Hoenicka J, Palomo T, Rubio G, Leza JC. The anti-inflammatory prostaglandin 15d-PGJ₂ and its nuclear receptor PPAR γ are decreased in schizophrenia. *Schizophr Res*. 2011; 15-52.
- Mashimo M, Hirabayashi T, Murayama T, Shimizu T. Cytosolic PLA₂ activation in Purkinje neurons and its role in AMPA-receptor trafficking. *J Cell Sci*. 2008; 121: 3015-24.

- Mathers CD, Lopez AD, Murray, C JL. The Burden of Disease and Mortality by Condition: Data, Methods, and Results for 2001. In: Lopez AD, Mathers CD, Ezatti M, Jamisson DT, Murray C JL. (eds). *Global Burden of Disease and Risk Factors*. New York: Oxford University Press, 2006.
- Menezes PR, Mann AH. Mortality among patients with non-affective functional psychoses in a metropolitan área of South-Eastern Brazil. *Rev Saude Publica*. 1996; 30: 304-9.
- Menezes PR, Scazufca M, Busatto GF, Coutinho LMS, McGuire PK, Murray RM. Incidence of first-contact psychosis in Sao Paulo, Brazil. *Br J Psychiatry*. 2007; 191: 102-6.
- Meyer U, Schwarz MJ, Müller N. Inflammatory processes in schizophrenia: a promising neuroimmunological target for the treatment of negative/ cognitive symptoms and beyond. *Pharmacol Ther*. 2011; 96-110.
- Mikkelsen JD, Thomsen MS, Hansen HH, Lichota J. Use of biomarkers in the discovery of novel anti-schizophrenia drugs. *Drug Discov Today*. 2010; 15: 137-41.
- Muma NA, Singh RK, Vercillo MS, D'Souza DN, Zemaitatis B, Garcia F, Damjanoska KJ, Zhang Y, Battaglia G, van de Kar LD. Chronic olanzapine activates the Stat3 signal transduction pathway and alters expression of components of the 5-HT_{2A} receptor signaling system in rat frontal cortex. *Neuropharmacology*. 2007; 53: 552-62.
- Nadri C, Kozlovsky N, Agam G, Bersudsky Y. GSK-3 parameters in lymphocytes of schizophrenic patients. *Psychiatry Res*. 2002; 112:51-7.
- Nadri C, Dean B, Scarr E, Agam G. GSK-3 parameters in *postmortem* frontal cortex and hippocampus of schizophrenic patients. *Schizophr Res*. 2004; 71: 377-82.
- Nakamura S. Effects of phospholipase A₂ inhibitors on the antidepressant-induced axonal regeneration of noradrenergic locus coeruleus neurons. *Microsc Res Tech*. 1994; 29: 204-10.
- Noordermeer J, Klingenhith J, Perrimon N, Nusse R. Dishevelled and armadillo act in the wingless signaling pathway in *Drosophila*. *Nature*. 1994; 367: 80-3.
- O'Brien WT, Harper AD, Jove F, Woodgett JR, Maretto S, Piccolo S, Klein PS. Glycogen synthase kinase-3 β haploinsufficiency mimics the behavioral and molecular effects of lithium. *J Neurosci*. 2004; 24: 6791-8.
- Organização Mundial da Saúde (OMS). *CID10 - Critérios diagnósticos para pesquisa*: 10^a Ed. Porto Alegre: Artmed; 1998.

- Owens MJ, Nemeroff CB. Role of serotonin in the pathophysiology of depression: focus on the serotonin transporter. *Clin Chem.* 1994; 40/2: 288-95.
- Padovani A, Borroni B, Colciaghi F, Pastorino L, Archetti S, Cottini E, Caimi L, Cattabeli F, di Luca M. Platelet amyloid precursor protein forms in AD: a peripheral tool and a pharmacological target. *Mech Ageing Dev.* 2001; 122: 1997-2004.
- Paixão C, Matias D, Alencar D, Nunes M, Sales P, Veiga PHA. Análise de prevalência dos transtornos psíquicos na região metropolitana do Recife. *Ciência & Saúde Coletiva.* 2009;14: 261-6.
- Pangerl AM, Stleude A, Jaroni HW, Rüfer R, Gattaz WF. Increased platelet membrane lysophosphocoline in schizophrenia. *Biol Psychiatry.* 1991; 30: 837-40.
- Pantelis C, Yucel M, Bora E, Fornito A, Testa R, Brewer WJ, Velakoulis D, Wood SJ. Neurobiological markers of illness onset in psychosis and schizophrenia: the search for a moving target. *Neuropsychol Rev.* 2009; 19: 385-98.
- Pearlson GD. Neurobiology of schizophrenia. *Ann Neurol.* 2000; 48: 556-6.
- Peet M, Laugharne JDE, Horrobin DF, Reynolds GP. Arachidonic acid: a common link in the biology of schizophrenia? *Arch Gen Psychiatry.* 1994; 51: 665-6.
- Peet M, Mellor J. Double-blind placebo controlled trial of N-3 polyunsaturated fatty acids as an adjunct to neuroleptics. *Schizophr Res.* 1998; 29: 160-1.
- Peet M. New strategies for the treatment of schizophrenia: omega-3 polyunsaturated fatty acids. In: Peet M, Glen I, Horrobin DF (eds) *Phospholipid spectrum disorder in psychiatry*. Carnforth, UK: Marius Press, 1999. p. 189-94.
- Perez R, Matabosch X, Llebaria A, Balboa MA, Balsinde J. Blockade of arachidonic acid incorporation into phospholipids induces apoptosis in U937 promonocytic cells. *J Lipid Res.* 2006; 47: 484-91.
- Petegrew JW, Keshavan MS, Minshew NJ. ³¹P nuclear magnetic resonance spectroscopy: Neurodevelopment and schizophrenia. *Schizophr Bull.* 1993; 19: 35-53.

- Pfeilschifter J, Schalkwijk C, Briner VA, van den Bosch H. Cytokine-stimulated secretion of group II phospholipase A₂ by rat mesangial cells. Its contribution to arachidonic acid release and prostaglandin synthesis by cultured rat glomerular cells. *J Clin Invest*. 1993; 92: 2516-23.
- Phillis JW, O'Regan MH. A potentially critical role of phospholipases in central nervous system ischemic, traumatic, and neurodegenerative disorders. *Brain Res Rev*. 2004; 44: 13-47.
- Piomelli D. Arachidonic acid in cell signaling. *Curr Opin Cell Biol*. 1993; 5: 274-80.
- Polakis P. The adenomatous polyposis coli (APC) tumor suppressor. *Biochim Biophys Acta*. 1997; 1332:F127-47.
- Polter AM, Li X. Glycogen synthase kinase-3 is an intermediate modulator of serotonin neurotransmission. *Front Mol Neurosci*. 2011; 4: 1-14.
- de Prada M, Censura AM, Launay JM. Platelets: as a model for neurones? *Experientia*. 1988; 44: 115-26.
- Revicki DA. Methods of pharmacoeconomic evaluation of psychopharmacology therapies for patients with schizophrenia. *J Psychiatry Neurosci*. 1997; 22:256-66.
- Rickard A, Portel C, Kell PJ, Vinson SM, McHowat J. Protease activated receptor stimulation activates a Ca²⁺-independent phospholipase A₂ in bladder microvascular endothelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005; 288: F714-21.
- Roh MS, Seo MS, Kim SH, Jeon WJ, Ahn YM, Kang UG, Juhnn YS, Kim YS. Haloperidol and clozapine differentially regulate signals upstream of glycogen synthase kinase 3 in the rat frontal cortex. *Experiment Mol Med*. 2007; 39: 353-60.
- Rosenheck R. Effectiveness Versus Efficacy of Second-Generation Antipsychotics: Haloperidol Without Anticholinergics as a Comparator. *Psychiatr Serv*. 2005; 56: 85-92.
- Rosenheck RA, Leslie DL, Sindelar J, Miller EA, Lin H, Stroup TS, McEvoy J, Davis SM, Keefe RSE, Swartz M, Perkins DO, Hsiao JK, Lieberman J. Cost-effectiveness of second-generation antipsychotics and piperphenazine in a randomized trial of treatment for chronic schizophrenia. *Am J Psychiatry* 2006; 163: 2080-9.
- Roshak AK, Capper EA, Stevenson C, Eichman C, Marshall LA. Human calcium-independent phospholipase A₂ mediates lymphocyte proliferation. *J Biol Chem*. 2000; 275: 35692-8.

- Ross BM, Hudson C, Erlich J, Warsh JJ, Kish SJ. Increased phospholipid breakdown in schizophrenia. Evidence for the involvement of a calcium-independent phospholipase A₂. *Arch Gen Psychiatry*. 1997; 54:487-94.
- Ross, BM. Phospholipid and eicosanoid signaling disturbances in schizophrenia. *Prostaglandins, Leukot and Essent Fatty Acids*. 2003; 69: 407-12.
- Rotrosen J, Wolkin A. *Phospholipid and prostaglandin hypotheses of schizophrenia*. In: Meltzer HY(ed). *Psychopharmacology: the third generation of Progress*. New York: Raven Press 1987. p. 759-64.
- Saha S, Chant D, Welham J, McGrath J. A systematic review of the prevalence of schizophrenia. *PLoS Med*. 2005; 2: 413-33.
- Salinas PC. Retrograde signalling at the synapse: a role for Wnt proteins. *Biochem Soc Trans*. 2005; 33: 1295-8.
- Schaeffer EL. *A inibição da atividade da fosfolipase A₂ no hipocampo de ratos prejudica a formação da memória de curta e de longa duração: implicações para a doença de Alzheimer*. [tese de doutorado] - Universidade de São Paulo. São Paulo, 2004.
- Schaffer B, Wiedau-Pazos M, Geschwind DH. Gene structure and alternative splicing of glycogen synthase kinase 3 beta (GSK-3beta) in neural and non-neural tissues. *Gene*. 2003; 302: 73-81.
- Schaloske RH, Dennis EA. The phospholipase A₂ superfamily and its group numbering system. *Biochim Biophys. Acta*. 2006; 1761: 1246-59.
- Schmitt A, Maras A, Petroianu G, Braus DF, Scheuer L, Gattaz WF. Effects of antipsychotic treatment on membrane phospholipid metabolism in schizophrenia. *J Neural Trans*. 2001; 108 (8-9):1081-91.
- Schmitt A, Wilczek K, Blennow K, Maras A, Jatzko A, Petroianu G, Braus DF, Gattaz WF. Altered thalamic membrane phospholipids in schizophrenia: a postmortem study. *Biol Psychiatry*. 2004 1; 56: 41-5.
- Schulze RM, Müller WE, Gattaz WF. A radioenzymatic assay for the determination of phospholipase A₂ in serum suitable for psychiatric and non-psychiatric patients. *Pharmacopsychiatry*. 1988; 21: 348-9.
- Schwarz E, Bahn S. Biomarker discovery in psychiatric disorders. *Electrophoresis*. 2008; 29: 2884-90.

- Schwarz E, Guest PC, Rahmoune H, Harris LW, Wang L, Leweke FM, Rothermundt M, Borgets B, Koethe D, Kranaster L, Ohrmann P, Suslow T, McAllister G, Spain M, Barnes A, van Beveren NJM, Barosm-Cohen S, Steiner J, Torrey FE, Yolken RH, Bahn S. Identification of a biological signature for schizophrenia in serum. *Mol Psychiatry*. 2011; no prelo. DOI: 10.1038/mp.2011.42.
- Seegers HC, Gross RW, Boyle WA. Calcium-independent phospholipase A₂-derived arachidonic acid is essential for endothelium-dependent relaxation by acetylcholine. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002; 302: 918-23.
- Shelat PB, Chalimoniuk M, Wang JH, Strosnajer, Lee JC, Sun AY, Simonyi A, Sun GY. Amyloid beta peptide and NMDA induce ROS from NAPH oxidase and AA release from cytosolic phospholipase A₂ in cortical neurons. *J Neurochim*. 2008; 106: 45-55.
- Shoval G, Weizman A. The possible role of neurotrophins in the pathogenesis and therapy of schizophrenia. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2005; 15: 319-29.
- Simonato M. A pathogenetic hypothesis of temporal lobe epilepsy. *Pharmacol Res*. 1993; 27: 217-25.
- Sing RK, Jia C, Garcia F, Carrasco GA, Battaglia G, Muma NA. Activation of the JAK-STAT pathway by olanzapine is necessary for desensitization of serotonin 2A receptor-stimulated phospholipase C signaling in rat frontal cortex but not serotonin 2A receptor-stimulated hormone release. *J Psychopharmacol*. 2010; 24: 1079-88.
- Smesny S, Kinder D, Willhardt I, Rosburg T, Lasch J, Berger G, Sauer H. Increased calcium-independent phospholipase A₂ activity in first but not multiepisode chronic schizophrenia. *Biol Psychiatry*. 2005; 57: 399 - 405.
- Song H, Ramanadham S, Bao S, Hsu F, Turk J. A bromoenol-lactone suicide substrate inactive group VIA phospholipase A₂ by generating a diffusible bromomethyl keto acid that alkylates cysteine thiols. *Biochemistry*. 2006; 45: 1061-73.
- Souza RP, Romano-Silva MA, Lieberman JA, Meltzer HY, Wong AH, Kennedy JL. Association study of GSK3 gene polymorphisms with schizophrenia and clozapine response. *Psychopharmacology (Berl)*. 2008; 200: 177-86.
- Stahl SM. The human platelet. A diagnostic and research tool for the study of biogenic amines in psychiatric and neurologic disorders. *Arch Gen Psychiatry*. 1977; 34: 509-16.

- Sun GY, Xu J, Jensen MD, Simonyi A. Phospholipase A₂ in the central nervous system: implications for neurodegenerative diseases. *J Lipid Research*. 2004; 45: 205-13.
- Sung GY, Horrocks LA. The acyl and alk-1-enyl groups of the major phosphoglycerides from brain myelin and mouse brain microsomal, mitochondrial and myelin fractions. *Lipids*. 1970; 5: 1006-12.
- Talib, LL. *Desenvolvimento de métodos para determinação da atividade das frações da fosfolipase A₂ em plaquetas* [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2006.
- Tandon R, Belmaker RH, Gattaz WF, Lopez-Ibor Jr JJ, Okasha A, Singh B, Stein DJ, Olie JP, Fleischhacker WW, Moeller HJ. For the section of Pharmacopsychiatry, World Psychiatric Association. World Psychiatry Association. Pharmacopsychiatry Section statement on comparative effectiveness of antipsychotics in the treatment of schizophrenia. *Schizophr Res*. 2008; 100: 20-38.
- Tavares Jr H, Yacubian J, Talib LL, Barbosa NR, Gattaz WF. Increased phospholipase A₂ activity in schizophrenia with absent response to niacin. *Schizophr Res* 2003; 61: 1 - 6.
- Toro CT, Deakin JFW. Adult neurogenesis and schizophrenia: a window on abnormal brain development? *Schiz Res*. 2007; 90: 1-14.
- Vessoni, AL. *Adaptação e estudo de confiabilidade da escala de avaliação das síndromes positiva e negativa para a esquizofrenia no Brasil* [dissertação]. São Paulo: Escola Paulista de Medicina; 1993.
- Vial D, Piomelli D. Dopamine D₂ receptors potentiate arachidonate release via activation of cytosolic, arachidonate-specific phospholipase A₂. *J Neurochem*. 1995; 64: 2765-72.
- Visioli F, Rodriguez EBT, Kreisman NR, Bazan NG. Membrane lipid degradation is related to interictal cortical activity in a series of seizures. *Metab Brain Dis*. 1994; 9: 161-70.
- Wannmacher L. Antipsicóticos Atípicos: Mais eficazes, mais seguros? *Uso Racional de medicamentos: temas selecionados*. 2004; 1: 1-6.
- Weinberger DR. Implications of normal brain development for the pathogenesis of schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry*. 1987; 44: 660-9.
- WHO – World Health Organization. *Schizophrenia*. Disponível em < http://www.who.int/mental_health/management/schizophrenia/en/ >. Acesso em 02 jun 2011a.

- WHO. *The global burden of disease: 2004 update*. Disponível em < http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GBD_report_2004update_full.pdf >. Acesso em 02 jun 2011b.
- Williamson P, Drost D, Stanley J, Carr T, Morrison S, Merskey H. Localized phosphorus 31 magnetic resonance spectroscopy in chronic schizophrenic patients and normal controls. *Arch Gen Psychiatry*. 1991; 48: 563-8.
- Wodarz A, Nusse R. Mechanisms of Wnt signaling in development. *Ann Rev Cell Dev Biol*. 1998; 14: 59-88.
- Wurch T, Boutet-Robinet EA, Palmier C, Colpaert FC, Pauwels PJ. Constitutive coupling of a chimeric dopamine D2/ $\alpha 1B$ receptor to the phospholipase C pathway: inverse agonism to silent antagonism by neuroleptic drugs. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003; 304: 380-390.
- Yakubian J, de Casto CC, Ometto M, Barbosa E, de Camargo CP, Tavares H, Cerri GG, Gattaz WF. 31P-spectroscopy of frontal lobe in schizophrenia: alterations in phospholipid and high-energy phosphate metabolism. *Schizophr Res*. 2002; 58: 117 - 22.
- Yang SD, Yu JS, Lee TT, Yang CC, Ni MH, Yang YY. Dysfunction of protein kinase FA/ GSK-3 α in lymphocytes of patients with schizophrenic disorder. *J Cell Biochem*. 1995; 59: 106-16.
- Yang TTC, Ung PMU, Rincón M, and Chow C. Role of the CCAAT/Enhancer-binding Protein NFATc2 Transcription Factor Cascade in the Induction of Secretory Phospholipase A₂. *J Biol Chem*. 1999; 281: 11541 - 11552.
- Yang YK, Tarn YH, Wang TY, Liu C, Laio Y, Chou Y, Lee S, Chen C. Pharmacoeconomic evaluation of schizophrenia in Taiwan: model comparison of long-acting risperidone versus olanzapine versus depot haloperidol based on estimated costs. *Psychiatry Clin Neurosci*. 2005; 59: 385-94.
- Yao JK, Sistilli CG, van Kammen DP. Membrane polyunsaturated fatty acids and CSF cytokines in patients with schizophrenia. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2003; 69: 429-36.
- Zhang XY, Tan YL, Cao LY, Wu GY, Xi Q, Shen Y, Zhou DF. Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in different forms of schizophrenia treated with typical and atypical antipsychotics. *Schizophr Res*. 2006; 81: 291-300.

Apêndice A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU
RESPONSÁVEL LEGAL**

1. NOME:
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO .M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO.....Nº.....APTO:.....
BAIRRO:.....CIDADE.....
CEP:.....TELEFONE:DDD(.....).....

2. RESPONSÁVEL LEGAL
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
DOCUMENTO DE IDENTIDADE :SEXO: M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO:.....Nº.....APTO:.....
BAIRRO:.....CIDADE:.....
CEP:.....TELEFONE: DDD(.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Influência do tratamento medicamentoso na atividade das PLA₂ e de GSK-3 em leucócitos e plaquetas de pacientes esquizofrênicos
PESQUISADOR : Wagner F. Gattaz
CARGO/FUNÇÃO: Professor Titular do Departamento de Psiquiatria da FMUSP

2. UNIDADE DO HCFMUSP: IPq

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO	X	RISCO MÉDIO	☐
RISCO BAIXO	☐	RISCO MAIOR	☐

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 3 anos

Pesquisas científicas realizadas na última década têm relatado alterações biológicas em pacientes com esquizofrenia. Dentre estas, foram detectadas alterações em atividades enzimáticas da PLA₂ e da GSK-3 possivelmente relacionadas como risco para a doença. O presente estudo tem como objetivo investigar se tais alterações ocorrem em pacientes esquizofrênicos

e como elas ocorrem. Como grupo comparativo, faremos as mesmas avaliações em indivíduos saudáveis. Esse estudo será realizado no Laboratório de Neurociências (LIM-27) no Departamento de Psiquiatria da FMUSP.

Caso você/ pessoa sob sua responsabilidade concorde em participar deste projeto, será feita uma avaliação clínica (rotineira) e realizada coleta única de sangue (volume de 40 mL - equivalente a 3 colheres de sopa) da veia do antebraço. As amostras serão utilizadas para as determinações enzimáticas e expressão gênica de PLA₂ e de GSK-3 e os valores serão correlacionados com as variáveis clínicas. Todo o material será codificado de modo que a identidade dos participantes não seja revelada.

Os desconfortos e riscos esperados são mínimos e decorrentes dos processos de coleta de sangue. Você/ pessoa sob sua responsabilidade poderá apresentar dor, desconforto ou hematoma quando o sangue for retirado.

Não há benefício direto para o participante; pois trata-se de estudo experimental testando a existência de variantes bioquímicas associadas à esquizofrenia. É possível, mas não garantido, que os pacientes com esta doença possam beneficiar-se dos resultados deste estudo no futuro, bem como seus familiares. De posse dos conhecimentos oriundos deste estudo, espera-se conseguir no futuro melhores estratégias para o tratamento e prevenção da referida doença.

Você/ pessoa sob sua responsabilidade pode perguntar sobre qualquer dúvida que tenha agora ou qualquer momento durante o estudo e poderá ter acesso às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa. O principal investigador é o Dr Wagner Farid Gattaz que pode ser encontrado na Rua Ovídio Pires de Campos, 785 – Telefone: (11) 3069-8010. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappelq@hcnet.usp.br

É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente;

O participante/ pessoa sob sua responsabilidade tem o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

Não há despesas pessoais para o participante/ pessoa sob sua responsabilidade em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), o

participante tem direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas.

Os pesquisadores se comprometem a utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “Influência do tratamento medicamentoso na atividade das PLA₂ e de GSK-3 em leucócitos e plaquetas de pacientes esquizofrênicos”.

Eu fui esclarecido pelos pesquisadores sobre a minha decisão em participar nesse estudo e ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar, quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

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

Assinatura da testemunha Data ____/____/____

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

(Somente para o responsável do projeto)

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

Prof. Dr. Wagner F. Gattaz

Responsável pelo estudo Data ____/____/____

Apêndice B – Aprovação dos projetos de Pesquisa pela CAPPesq

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 24/09/2008, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0668/08**, intitulado: **"INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO MEDICAMENTOSO NA ATIVIDADE DAS PLA2 E DE GSK-3 EM LEUCÓCITOS E PLAQUETAS DE PACIENTES ESQUIZOFRÊNICOS."** apresentado pelo Departamento de **PSIQUIATRIA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

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

Pesquisador (a) Responsável: **Prof. Dr. Wagner Farid Gattaz**

Pesquisador (a) Executante: **Aline Siqueira Ferreira**

CAPPesq, 25 de Setembro de 2008

Recebido: 26/09/08, às 12h
Departamento de Psiquiatria da FMUSP

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

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 16/12/2009, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **1234/09**, intitulado: "**INVESTIGAÇÃO DE ENDOFENÓTIPOS E FATORES PROGNÓSTICOS EM PSICOSES DE PRIMEIRO EPISÓDIO: ESTUDO LONGITUDINAL ENVOLVENDO ASPECTOS CLÍNICOS, NEUROPSICOLOGIA, GENÉTICA, NEUROQUÍMICA E NEUROIMAGEM.**" apresentado pelo Departamento de **PSIQUIATRIA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

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

Pesquisador (a) Responsável: **Paulo Clemente Sallet**

CAPPesq, 22 de Dezembro de 2009

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

Apêndice C – Escala de Avaliação das Síndromes Positiva e Negativa

Data: __/__/__ Entrevistador: _____ Hora início: _____

Circule o escore apropriado para cada item:

1=Ausente 2=Mínimo 3=Leve 4=Moderado 5=Moderadamente grave 6=Grave 7=Extremo

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

Escore Positivo: _____.

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

Escore Negativo: _____.

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 pensamento	1	2	3	4	5	6	7
G10 – Desorientação	1	2	3	4	5	6	7
G11 – Deficit atenção	1	2	3	4	5	6	7
G12 – Juízo e crítica	1	2	3	4	5	6	7
G13 – Distúrbio volição	1	2	3	4	5	6	7
G14 – Mau controle impulso	1	2	3	4	5	6	7
G15 – Preocupação	1	2	3	4	5	6	7
G16 – Esquiva social ativa	1	2	3	4	5	6	7

Escore Geral: _____.

PANSS Total: _____.

Hora término: _____