

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**Marcelo Soares Fernandes**

**INFLUÊNCIA DE FATORES FARMACOLÓGICOS E NUTRICIONAIS  
NA RESPOSTA OXIDATIVA-INFLAMATÓRIA *IN VITRO* INDUZIDA  
PELA OLANZAPINA**

**Santa Maria, RS  
2019**



**Marcelo Soares Fernandes**

**INFLUÊNCIA DE FATORES FARMACOLÓGICOS E NUTRICIONAIS NA  
RESPOSTA OXIDATIVA-INFLAMATÓRIA *IN VITRO* INDUZIDA PELA  
OLANZAPINA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutor em Farmacologia**.

Orientadora: Profa. Dra. Ivana Beatrice Mânica da Cruz  
Coorientadora: Profa. Dra. Fernanda Barbisan

Santa Maria, RS  
2019

Fernandes, Marcelo Soares  
INFLUÊNCIA DE FATORES FARMACOLÓGICOS E NUTRICIONAIS NA  
RESPOSTA OXIDATIVA-INFLAMATÓRIA IN VITRO INDUZIDA PELA  
OLANZAPINA / Marcelo Soares Fernandes.- 2019.  
169 p.; 30 cm

Orientadora: Ivana Beatrice Mânica da Cruz  
Coorientadora: Fernanda Barbisan  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós  
Graduação em Farmacologia, RS, 2019

1. Antipsicóticos 2. Síndrome metabólica 3. Lítio 4.  
Inflamação 5. Fruto Amazônico I. Cruz, Ivana Beatrice  
Mânica da II. Barbisan, Fernanda III. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

---

© 2019

Todos os direitos autorais reservados a Marcelo Soares Fernandes. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

Endereço: Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS) - Rua Capitão Araújo, n. 20, Bairro Centro, Passo Fundo, RS. CEP: 99010-200

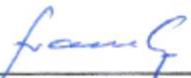
Fone: (54) 9 8443.9833; (48) 9 9638.5225 E-mail: marcelo.fernandes@uffs.edu.br

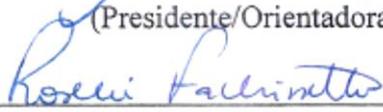
**Marcelo Soares Fernandes**

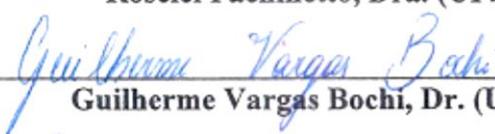
**INFLUÊNCIA DE FATORES FARMACOLÓGICOS E NUTRICIONAIS NA  
RESPOSTA OXIDATIVA-INFLAMATÓRIA *IN VITRO* INDUZIDA PELA  
OLANZAPINA**

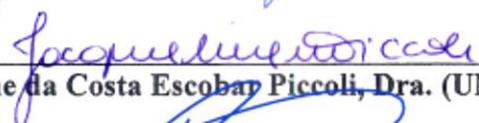
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutor em Farmacologia**.

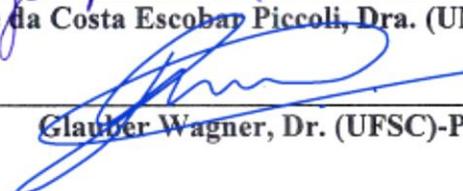
**Aprovado em 13 de março de 2019:**

  
\_\_\_\_\_  
**Ivana Beatrice Mânica da Cruz, Dra. (UFSM)**  
(Presidente/Orientadora)

  
\_\_\_\_\_  
**Roselei Fachinetto, Dra. (UFSM)**

  
\_\_\_\_\_  
**Guilherme Vargas Bochi, Dr. (UFSM)**

  
\_\_\_\_\_  
**Jacqueline da Costa Escobar Piccoli, Dra. (UNIPAMPA)-Parecer**

  
\_\_\_\_\_  
**Glauber Wagner, Dr. (UFSC)-Parecer**

Santa Maria, RS  
2019



## DEDICATÓRIA

*Dedico todo esforço, suor e aprendizado deste trabalho:*

*Aos meus saudosos pais Jaime e Dorly;*

*Aos meus segundos pais Carlos e Iolanda;*

*A minha esposa Fran;*

*A minha filha Lara;*

*A todos os meus irmãos, especialmente, ao meu irmão Manoel, por me ensinar a ver o mundo de uma forma diferente.*



## AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Ivana Beatrice Mânica da Cruz, os meus mais sinceros agradecimentos. Ivana, você é a força propulsora responsável pelo desenvolvimento do trabalho aqui apresentado. Agradeço a oportunidade de ser seu orientando não apenas por sua qualidade técnica, visão científica, reconhecimento nacional e internacional, mas, principalmente, por ter me dado a oportunidade de conhecê-la. Descobri uma pesquisadora com uma simplicidade e visão humana ímpar no modo como lida com os seus orientandos. Você tem luz própria, ilumina e contagia quem está ao seu redor a querer fazer pesquisa. Você tem a sensibilidade de enxergar o ritmo de cada um, sem exigir, mas sempre estimulando. “Turbilhão de ideias” poderia ser um nome alternativo para descrevê-la, ou talvez, “coração de mãe”, pois é infinita tanto a tua capacidade de criar novos projetos como a tua capacidade de acolher novos pesquisadores. Talvez seja essa a fórmula do teu sucesso: “amar o que faz”. Agradeço Ivana, por ter me contagiado com o “brilho nos olhos” e permitir que, após tantos anos, eu retorne ao mundo da pesquisa. Com certeza tenho muito que caminhar e lacunas a preencher, mas agradeço muitíssimo por você ter contribuído com a minha formação. Foi literalmente uma “experiência” que levarei para a minha vida toda! Muito Obrigado!

Agradeço a minha co-orientadora, Fernanda Barbisan, por toda a dedicação, solidariedade e total apoio (e foram inúmeros) ao longo desse período de doutoramento. Não há palavras adequadas para descrever o nível de comprometimento da Fernanda com as atividades do laboratório e desenvolvimento de pesquisas. Não apenas pelo total domínio técnico e científico, mas especialmente, na questão da integração do grupo de pesquisa. Assim como a Ivana, a Fernanda tem um coração enorme e, sempre me ofereceu condições e oportunidades de desenvolver os trabalhos e aprender cada vez mais. Ter uma co-orientadora como a Fernanda para mim foi um privilégio. Obrigado por tudo Fernanda!

Agradeço a toda a equipe (família) do laboratório de Biogenômica que, direta ou indiretamente, contribuíram com a minha formação. Meu especial agradecimento ao Charles E. Assmann que me socorreu inúmeras vezes oferecendo suporte técnico e, principalmente, o seu apoio a qualquer momento. A Verônica Azzolin, em especial, foi a primeira pessoa que conheci ao visitar o laboratório. Verônica, agradeço não apenas por aprender contigo as questões técnicas, mas principalmente, por me sentir acolhido desde o primeiro dia. Agradeço a Audrei Alvez, Cibele F. Teixeira, Grazielle Castagna, Micheli Jobim, Moisés H. Mastella, Neida Pellenz, Thamara Flores e Thiago Duarte por oportunizarem um ótimo convívio e relação de

amizade ao longo desse período. Agradeço a todos os ICs (e são muitos) e, em especial, a Elisa Abbad e Michel Muniz pelo convívio, dedicação e contribuição em atividades de pesquisa.

Agradeço ao doutorando Getúlio Nicola Bressan, pela disponibilidade, dedicação e imensa capacidade de compartilhar o seu tempo e conhecimento.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da UFSM pelo apoio ao longo do doutoramento. Especial agradecimento aos docentes Liliane de Freitas Bauermann, Maria Amália Pavanato, Roselei Fachineto e Guilherme V. Boch que, direta ou indiretamente, contribuíram na minha formação. Agradeço a servidora (secretária) Zeli que foi incansável em dar o suporte necessário em questões envolvendo o programa de pós-graduação.

Agradeço aos docentes Claudia G. Bica (UFCSPA), Glauber Wagner (UFSC) e Jacqueline da Costa E. Piccoli (UNIPAMPA) pelas importantes contribuições no processo de qualificação dos pós-graduandos do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da UFSM.

Aos meus pais Jaime e Dorly (*in memoriam*) por terem construído os alicerces que permitiram eu ser quem sou hoje. A esses dois espelhos de minha vida, o meu mais profundo agradecimento.

Agradeço a minha esposa Francine Feltrin pelo amor, confiança, companheirismo e total apoio durante toda a jornada que compartilhamos juntos e, em especial, nesse período do doutorado que envolveu tantas mudanças e adaptações.

Agradeço a minha filha Lara (minha princesa), agora com 8 anos, por me fazer um homem (um pai) melhor. Agradeço o sorriso espontâneo, as brincadeiras, as perguntas inesperadas, os “micos” e situações inusitadas que arrancaram gargalhadas e lembranças que jamais serão esquecidas. É essa força mágica diária que deram a alegria necessária para poder enfrentar, com o coração mais leve, os desafios que surgiram.

Agradeço ao meu sogro, Carlos e, minha sogra, Iolanda pelo apoio em todos os momentos, pelas mensagens de fé, apoio e solidariedade e por se mostrarem um porto seguro, um farol iluminando o caminho. Especial agradecimento a Caroline Feltrin (Carol) pelo suporte oferecido e, especialmente, pela paciência e solidariedade.

Agradeço a toda a família Fernandes (e são muitos!), pelo apoio em todo esse período.

Agradeço a Universidade Federal da Fronteira Sul-UFFS pelo apoio institucional para a formação docente. Especial agradecimento a Vanderlei Farias, Rafael Kremer, Júlio Stobbe, Leandro Tuzzin, Vanderléia Pulga, Amauri Simonetti, Gustavo Acrani e Rogério Riffel pelo apoio e incentivo ao longo dessa jornada de aprimoramento.

*Não julgue a eternidade por este momento.*

*(Vera Soares Fernandes)*



## RESUMO

### INFLUÊNCIA DE FATORES FARMACOLÓGICOS E NUTRICIONAIS NA RESPOSTA OXIDATIVA-INFLAMATÓRIA *IN VITRO* INDUZIDA PELA OLANZAPINA

AUTOR: Marcelo Soares Fernandes  
ORIENTADORA: Ivana Beatrice Mânica da Cruz  
COORIENTADORA: Fernanda Barbisan

**Introdução:** A olanzapina (OLZ) é um antipsicótico de segunda geração (ASG) utilizado no tratamento da esquizofrenia, transtorno bipolar e outras condições neuropsiquiátricas. Os efeitos adversos dos ASG incluem ganho de peso e alterações metabólicas que aumentam o risco de desenvolver obesidade, diabetes e distúrbios cardiovasculares. Estudos têm associado os efeitos adversos metabólicos dos ASG com um estado inflamatório de baixo grau e crônico, envolvendo células do sistema imune e estresse oxidativo. É possível que respostas oxidativas e inflamatórias provocadas por OLZ, possam sofrer influência de interações nutricionais e farmacológicas. O lítio, um estabilizador de humor, também utilizado em esquizofrenia e transtorno bipolar, tem apresentado efeitos pró ou anti-inflamatórios e, portanto, poderia modular a resposta inflamatória e oxidativa induzida pela OLZ. O açaí (*Euterpe oleracea* Mart.), uma fruta amazônica, também poderia influenciar esses efeitos provocados pela OLZ por apresentar propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias. **Objetivo:** avaliar *in vitro* a influência de fatores farmacológicos e nutricionais na resposta oxidativa e inflamatória induzida pela OLZ. **Metodologia:** A linhagem celular de macrófagos RAW 264.7 foi exposta, *in vitro*, por 72h a diferentes concentrações de OLZ e avaliada a proliferação celular. Uma concentração de OLZ foi selecionada. No mesmo modelo celular, em um segundo protocolo experimental, a concentração de OLZ selecionada foi associada com o Lítio (0,7 mEq/L) e no terceiro protocolo a OLZ foi associada com o extrato hidroalcoólico do açaí. Foram avaliados: (1) taxa de proliferação celular (2) marcadores oxidativos (3) marcadores inflamatórios (4) marcadores apoptóticos. **Resultados:** As diferentes concentrações da OLZ indicaram um efeito hormético na proliferação de macrófagos em 72h. A concentração de OLZ selecionada (0,03µg/mL) apresentou efeitos pró-oxidativos com elevação do ânio superóxido (AS), óxido nítrico (ON) e espécies reativas de oxigênio (EROs). A OLZ apresentou efeitos pró-inflamatórios com a elevação de todas as citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, TNF-α) e redução da citocina anti-inflamatória (IL-10). A exposição do lítio aos macrófagos per se, também desencadeou uma resposta oxidativa e inflamatória, mas com tênue elevação da proliferação celular, AS, EROs e IL-1β. No entanto, a associação do lítio com a OLZ, foi capaz de atenuar a elevação de todos os marcadores oxidativos e inflamatórios induzidos pela OLZ e, atenuar a redução dos níveis de IL-10. O açaí exposto aos macrófagos per se, não desencadeou aumento da proliferação celular ou de marcadores oxidativos e inflamatórios. O açaí (5µg/mL) associado com a OLZ atenuou a elevação dos níveis de marcadores oxidativos, inflamatórios e apoptóticos (caspases 1, 3 e 8) induzidos pela OLZ, como também, atenuou a redução da IL-10. **Conclusão:** Apesar das limitações relacionadas aos estudos *in vitro*, o conjunto dos resultados sugerem que componentes farmacológicos e nutricionais poderiam atenuar a ação pró-oxidativa e pró-inflamatória da OLZ sobre os macrófagos, como é o caso do lítio e do açaí. Assim, interações farmacológicas e nutricionais poderiam ser uma estratégia relevante para minimizar os efeitos adversos periféricos da OLZ, decorrentes do perfil oxidativo-inflamatório. Estudos *in vivo* complementares serão necessários para corroborar estes resultados.

**Palavras-chave:** Antipsicóticos. Síndrome metabólica. Lítio. Inflamação. Fruto Amazônico.



## ABSTRACT

### INFLUENCE OF PHARMACOLOGICAL AND NUTRITIONAL FACTORS ON THE *IN VITRO* OXIDATIVE-INFLAMMATORY RESPONSE INDUCED BY OLANZAPINE

AUTHOR: Marcelo Soares Fernandes  
ADVISOR: Ivana Beatrice Mânica da Cruz  
COORIENTATOR: Fernanda Barbisan

Introduction: Olanzapine (OLZ) is a second generation antipsychotic (ASG) used in the treatment of schizophrenia, bipolar disorder and other neuropsychiatric conditions. The adverse effects of ASG include weight gain and metabolic changes that increase the risk of developing obesity, diabetes, and cardiovascular disorders. Studies have associated the metabolic adverse effects of ASG with a low-grade and chronic inflammatory state, involving immune system cells and oxidative stress. It is possible that oxidative and inflammatory responses caused by OLZ may be influenced by nutritional and pharmacological interactions. Lithium, a mood stabilizer, also used in schizophrenia and bipolar disorder, has shown pro or anti-inflammatory effects and therefore could modulate the inflammatory and oxidative response induced by OLZ. The açai (*Euterpe oleracea* Mart.), an amazonian fruit, could also influence these effects caused by OLZ, because it exhibits antioxidant and anti-inflammatory properties. Objective: to evaluate in vitro the influence of pharmacological and nutritional factors on the oxidative and inflammatory response induced by OLZ. Methodology: The RAW 264.7 macrophage cell line was exposed in vitro for 72h at different concentrations of OLZ and cell proliferation was evaluated. An OLZ concentration was selected. In the same cell model, in a second experimental protocol, the selected OLZ concentration was associated with lithium (0.7 mEq / L) and in the third protocol the OLZ was associated with the hydroalcoholic extract of açai. We evaluated: (1) cell proliferation rate (2) oxidative markers (3) inflammatory markers (4) apoptotic markers. Results: Different concentrations of OLZ indicated a hormetic effect on macrophage proliferation in 72h. The selected OLZ concentration (0.03 µg / mL) presented pro-oxidative effects with elevated superoxide anion (SA), nitric oxide (NO) and reactive oxygen species (ROS). OLZ presented pro-inflammatory effects with elevation of all pro-inflammatory cytokines (IL-1, IL-6, TNF-α) and reduction of the anti-inflammatory cytokine (IL-10). Exposure of lithium to macrophages per se also triggered an oxidative and inflammatory response, but with a slight elevation of cell proliferation, AS, ROS and IL-1β. However, the association of lithium with OLZ was able to attenuate the elevation of all oxidative and inflammatory markers induced by OLZ and attenuate the reduction of IL-10 levels. Açai exposed to macrophages per se did not trigger increased cell proliferation or oxidative and inflammatory markers. The açai (5 µg / mL) associated with OLZ attenuated the elevation of OLZ-induced levels of oxidative, inflammatory and apoptotic markers (caspases 1, 3 and 8), as well as attenuated the reduction of IL-10. Conclusion: Despite the limitations related to the in vitro studies, the results suggest that pharmacological and nutritional components could attenuate the pro-oxidative and pro-inflammatory action of OLZ on macrophages, such as lithium and açai. Thus, pharmacological and nutritional interactions could be a relevant strategy to minimize the peripheral adverse effects of OLZ, due to the oxidative-inflammatory profile. Complementary in vivo studies will be needed to corroborate these findings.

**Keywords:** Antipsychotics. Metabolic syndrome. Lithium. Inflammation. Amazonian fruit.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### INTRODUÇÃO

Quadro 1 - Características essenciais que definem os transtornos psicóticos (DSM-V).....	24
Figura 1 - Principais características e hipóteses da esquizofrenia. O transtorno apresenta etiologia desconhecida e surge principalmente na adolescência e início da idade adulta. As principais hipóteses envolvem: Genética, ambiente, neurodesenvolvimento, estrutura e função do SNC e neurotransmissores. Antipsicóticos atuam como antagonistas de receptores dopaminérgicos (D2).....	25
Figura 2 - Esquema geral do bloqueio de receptores de dopamina (RD) nas vias dopaminérgicas por APG e seus principais efeitos neurofisiológicos e nas manifestações clínicas da esquizofrenia.....	27
Figura 3 - Estrutura química da olanzapina .....	30
Figura 4 - Alta afinidade da OLZ com receptores 5HT2A e baixa com D2. Dissociação entre efeitos motores e efeitos terapêuticos da OLZ .....	32
Figura 5 - Representação esquemática do tempo para desenvolver alterações metabólicas em indivíduos tratados com ASG e pacientes diabéticos tipo 2.....	34
Figura 6 - Possíveis alvos dos antipsicóticos no organismo na disfunção metabólica .....	37
Figura 7 - Atuação de enzimas antioxidantes e efeitos dos radicais livres.....	39
Figura 8 - Antipsicóticos de segunda geração induzem disfunção mitocondrial .....	42
Figura 9 - Polarização de macrófagos. Rota M1 (ativação clássica) e M2 (ativação alternativa) .....	44
Figura 10 - Vias comuns de inflamação entre a obesidade/síndrome metabólica e a provocada pelos ASG .....	49
Figura 11 - Interrelação entre estresse oxidativo e inflamação. Possibilidade de fatores nutricionais e farmacológicos poderem influenciar na modulação oxi-inflamatória da OLZ..	51
Figura 12 - Ação anti-inflamatória do lítio é influenciada por fatores genéticos, nutricionais e fármacos antidepressivos .....	55
Figura 13 - Ilustrações do <i>Euterpe oleracea</i> (Açaí). (A) Palmeira com cachos contendo o fruto; (B) frutos maduros de açaí colhidos .....	57
Figura 14 - Principais ações neuroprotetoras do açaí .....	58
Figura 15 - Ações do açaí relacionada a obesidade, síndrome metabólica, estresse oxidativo e inflamação.....	60

### DELINEAMENTO METODOLÓGICO GERAL

Figura 16 - Protocolo experimental 1 .....	64
Figura 17 - Protocolo experimental 2 e 3 .....	65

### ARTIGO 1

**Fig 1.** Effect on RAW macrophages cellular proliferation in 72 h cultures e cellular of OLZ (OLZ) at different concentrations. C = non-treated cells; PHA = cells activated by phytohemagglutinin antigen exposure. Treatments were compared using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Tukey *post hoc* test. Different letters (i.e., A, B, C, D, E, F) indicated significant statistical differences among treatments at  $p < 0.05$ . Treatments with A letter were considered with values similar to C group..... 79

**Fig 2.** Comparison of cell cycle determined by flow cytometry analysis among RAW macrophages 72 h cultures exposed OLZ (OLZ) at 0.03  $\mu\text{g/mL}$  concentration and to Phytohaemagglutinin (PHA), an natural antigen that trigger inflammatory macrophages activation. (A) Representative graphics with cell phases: (G0/G1 = gap 1; S = synthesis; G2/M = gap2 and mitosis). (B) % of cells the control in at each stage (G0/G1 = gap 1; S = synthesis; G2/M = gap2 and mitosis) of the cell cycle compared by One-way analysis of

variance (ANOVA) , followed by the Tukey *post hoc* test. The different letters (i.e., A, B, C, D, E, F) indicate statistical differences in each treatment at  $p < 0.05$ . (C) Monolayer culture pattern of RAW macrophages microscopic optic analysis ( $\times 40$ , scale bar=20  $\mu\text{m}$ ) in control (C) cells and cells exposed to OLZ and PHA. No-activated C-cells presented higher frequency of spheric cells typical of monocytes. Cells PHA and OLZ exposed presenting a macrophage spreading pattern that is observed in inflammatory-activated cells. .... 80

**Fig 3.** Interaction between OLZ (0.03  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and Li (0.7 mEq/L) on proliferation (A) and modulation of oxidative markers superoxide anion (SA), reactive oxygen species (ROS), and nitric oxide (NO) (B). Treatments were compared by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Tukey *post hoc* test. The different letters (i.e., A, B, C, D) indicate statistical differences in each treatment at  $p < 0.05$ . Treatments identified with A-letter were statistically similar to untreated-cells group (C). .... 82

**Fig 4.** Modulation of protein and gene expression cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ , IL-10) involved with inflammatory response of RAW macrophages exposed to OLZ (OLZ, 0.03  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and Li (Li, 0.7 mEq/L). Treatments were compared by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Tukey *post hoc* test. The different letters (i.e., A, B, C, D) indicate statistical differences in each treatment at  $p < 0.05$ . Treatments with A letter were considered with values similar to control untreated-cells group. Gene expression of each cytokine in each treatment is represented by colored squares (black = gene expression similar to C-group; green square = gene overexpression  $> 1.2 < 10$  times than C-group; yellow square = gene overexpression  $> 10 < 50$  times than C-group; red square = gene overexpression  $> 50$  times than C-group. The beta-actin housekeeping was used as internal control to normalized gene expression analysis among treatments. .... 84

## ARTIGO 2

Figure 1- Cell proliferation of OLZ (0.03  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), açai concentration-effect curve (0.01, 0.05, 0.1, 1, 5, and 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and associations was assessed in macrophages after 72 h by MTT assay. Data are presented as percentage of the untreated control group (negative control). PHA (125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) was used as a positive inflammatory control. Statistical comparison was performed by one-way analysis of variance followed by Tukey's *post hoc* test. Different letters indicate significant differences. C=Negative control; PHA=phytohemagglutinin; OLZ=olanzapine. .... 109

Figure 2- Oxidative Markers. ROS (A) and NO (B) production levels of OLZ (0.03  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), açai concentration-effect curve (0.01, 0.05, 0.1, 1, 5, and 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and associations was assessed in macrophage cells after 72 h. Data were statistically compared by one-way analysis of variance followed by Tukey's *post hoc* test. Different letters indicate significant differences. Data are presented as percentage of the untreated control group (negative control). PHA (125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) was used as a positive inflammatory control. C=Negative control; PHA=phytohemagglutinin; OLZ=olanzapine. .... 110

Figure 3- Effects of OLZ (0.03  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), açai (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and associations on pro-inflammatory (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , and IFN- $\gamma$  cytokines and anti-inflammatory cytokine (IL-10, E) levels measured by immunoassay in 72h cell cultures. Data are presented as percentage of the untreated control group (negative control). Data were statistically compared by one-way analysis of variance followed by Tukey's *post hoc* test. Different letters indicate significant differences. PHA (125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) was used as a positive inflammatory control. Different letters indicate significant differences. C=Negative control; PHA=phytohemagglutinin; OLZ=olanzapine. .... 112

Figure 4- Effects of OLZ (0.03  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), açai (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and associations on caspases levels measured by immunoassay. Data are presented as percentage of PHA (125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) was used as a positive inflammatory control. Different letters indicate significant differences. C=Negative control; PHA=phytohemagglutinin; OLZ=olanzapine. .... 113

Figure 5- Synthesis of main effects of açai hydro-alcoholic extract (5 µg/mL) on RAW macrophages cells activated by olanzapine (OLZ), an antipsychotic drug at 0.03 µg/mL concentration. Açai-extract was able to reduce partially oxidative, apoptotic and inflammatory markers that are increased in macrophage just OLZ-exposed. M1= classical via; M2= alternative via of inflammatory response. IL-1β= Interleukin 1β. IL-6=Interleukin 6. TNF-α= Tumor Necrosis Factor alpha IFN-γ= Interferon gamma. IL-10= Interleukin 10. ROS=Reactive Oxygen Species. NO= Nitric Oxide. Brown arrows with (-) = indicate the effect of açai attenuation on oxy-inflammatory markers of cells exposed to OLZ. .... 116



## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

APG	Antipsicóticos de primeira geração
ANOVA	Análise de variância (do inglês, <i>analysis of variance</i> )
ASG	Antipsicóticos de segunda geração
AS	Ânio Superóxido
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosina trifosfato
C	Citosina
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CAT	Catalase
CATIE	<i>Clinical Antipsychotic Trials of Intervention Effectiveness</i>
CMSP	Células Mononucleares do Sangue Periférico
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
COX-2	Ciclooxigenase-2
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CT	<i>Cytosine-Timine</i>
DCFH-DA	2'-7'-diclorofluoresceína diacetato
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetil Sulfóxido (do inglês, <i>Dimethyl sulfoxide</i> )
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês, <i>Deoxyribonucleic acid</i> )
DSM-V	Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais - quinta edição (do inglês, <i>Diagnostic and Statistical Manual fifth- edition</i> )
EROs	Espécies reativas de oxigênio
EUA	Estados Unidos da América
FAPEAM	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas
FBS	Soro Bovino fetal (do inglês, <i>Fetal bovine serum</i> )
GPx	Glutationa peroxidase
GSK-3 $\beta$	Glicogênio sintase quinase três beta
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
HDL	Lipoproteína de alta densidade (do inglês, <i>High Density Lipoproteins</i> )
IFN $\gamma$	Interferon gama
IL-10	Interleucina dez
IL-1 $\beta$	Interleucina um beta
IL-4	Interleucina quatro
IL-6	Interleucina seis
IL-8	Interleucina oito
IMC	Índice de massa corporal
LDL	Lipoproteína de baixa densidade (do inglês, <i>Low Density Lipoproteins</i> )
LPS	Lipopolissacarídeo (do inglês, <i>Lipopolysaccharide</i> )
M1	Macrófagos da rota inflamatória clássica
M2	Macrófagos da rota inflamatória alternativa
MCP-1	Proteína de quimioatração de monócito-1 (do inglês, <i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i> )
mEq	Miliequivalentes
MTD	Monitoramento terapêutico de drogas
MTT	Brometo de (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-Difenil Tetrazolium
NBT	Nitro azul de tetrazólio (do inglês, <i>Nitroblue tetrazolium</i> )
NF- $\kappa\beta$	Fator Nuclear - <i>kappa beta</i> (do inglês, <i>nuclear factor- kappa beta</i> )

NMDA	N-metil D-Aspartato
O <sup>2-</sup>	Superóxido
OH <sup>-</sup>	Radical hidroxila
OLZ	Olanzapina
ON	Óxido nítrico
ONOO <sup>-</sup>	Peroxinitrito
PBMCs	Células mononucleares do sangue periférico (do inglês, <i>Peripheral blood mononuclear cells</i> )
PHA	Fitohemaglutinina (do inglês, <i>Phytohemagglutinin</i> )
PI	Iodeto de propídeo
qRT-PCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
RD	Receptores de dopamina
RNA	Ácido ribonucleico (do inglês, <i>Ribonucleic acid</i> )
RNA <sub>m</sub>	RNA mensageiro
ROS	Espécies reativas de oxigênio (do inglês, <i>Reactive oxygen species</i> )
S	Síntese (do inglês, <i>Synthesis</i> )
SA	Ânio superóxido (do inglês, <i>Superoxide anion</i> )
SD	Desvio padrão (do inglês, <i>Standard deviation</i> )
SNC	Sistema nervoso central
SOD	Superóxido dismutase
TGF-β	Fator de transformação do crescimento- β (do inglês, <i>Transforming growth factor beta</i> )
TNF-α	Fator de necrose tumoral α (do inglês, <i>Tumor necrosis factor- α</i> )

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	23
1.1	A ESQUIZOFRENIA E O SURGIMENTO DOS ANTIPSIKÓTICOS.....	23
<b>1.1.1</b>	<b>Antipsicóticos de primeira geração</b> .....	26
1.1.1.1	<i>Mecanismos de ação</i> .....	26
1.1.1.2	<i>Efeitos adversos</i> .....	28
1.2	ANTIPSIKÓTICOS DE SEGUNDA GERAÇÃO .....	28
<b>1.2.1</b>	<b>Olanzapina</b> .....	29
1.2.1.1	<i>Mecanismos de ação da OLZ</i> .....	30
1.2.1.2	<i>Efeitos adversos</i> .....	32
1.3	ASG E SUA RELAÇÃO COM GANHO DE PESO E DISTÚRBIOS METABÓLICOS .....	33
<b>1.3.1</b>	<b>ASGs e o ganho de peso</b> .....	33
<b>1.3.2</b>	<b>Alterações metabólicas desencadeadas pelos ASGs</b> .....	35
<b>1.3.3</b>	<b>Mecanismos propostos</b> .....	36
1.4	ASG E O METABOLISMO OXIDATIVO .....	37
<b>1.4.1</b>	<b>Metabolismo oxidativo</b> .....	37
<b>1.4.2</b>	<b>ASG e sua relação com o estresse oxidativo</b> .....	40
1.5	ASSOCIAÇÃO ENTRE ASG, OBESIDADE E INFLAMAÇÃO .....	43
<b>1.5.1</b>	<b>Sistema imune e inflamação</b> .....	43
<b>1.5.2</b>	<b>Obesidade/síndrome metabólica e inflamação</b> .....	45
<b>1.5.3</b>	<b>ASG e inflamação</b> .....	47
1.6	INTERRELAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO E INFLAMAÇÃO E A MODULAÇÃO POR FATORES EXÓGENOS.....	49
1.7	LÍLIO, UM ESTABILIZADOR DO HUMOR, COM AÇÃO MODULADORA OXIDATIVA – ANTI-INFLAMATÓRIA .....	51
<b>1.7.1</b>	<b>O lítio e o metabolismo oxidativo</b> .....	52
<b>1.7.2</b>	<b>O lítio e a inflamação</b> .....	53
1.8	O AÇAÍ COMO MODULADOR DA RESPOSTA OXIDATIVA/INFLAMATÓRIA .....	56
<b>1.8.1</b>	<b>Ações neuroprotetoras do açaí</b> .....	57
<b>1.8.2</b>	<b>Ações do açaí relacionadas a obesidade, síndrome metabólica, estresse oxidativo e inflamação</b> .....	59
1.9	HIPÓTESE DO ESTUDO.....	60
1.10	OBJETIVOS .....	61
<b>1.10.1</b>	<b>Objetivo geral</b> .....	61
<b>1.10.2</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	61
<b>2</b>	<b>DELINEAMENTO METODOLÓGICO GERAL</b> .....	63
2.1	PROTOCOLO EXPERIMENTAL 1.....	63
2.2	PROTOCOLO EXPERIMENTAL 2.....	64
2.3	PROTOCOLO EXPERIMENTAL 3.....	64
<b>3</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	67
<b>4</b>	<b>ARTIGO 1 - LITHIUM IS ABLE TO MINIMIZE OLANZAPINE OXIDATIVE-INFLAMMATORY INDUCTION ON MACROPHAGE CELLS</b> .....	69
<b>5</b>	<b>ARTIGO 2 - AÇAÍ (EUTERPE OLERACEA MART.) MODULATES IN VITRO PRO-INFLAMMATORY RESPONSE INDUCED BY OLANZAPINE, AN ANTIPSYCHOTIC DRUG</b> .....	101
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	129
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	137

<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>139</b>
<b>ANEXO A - COMPROVANTE DE PUBLICAÇÃO ARTIGO 1 .....</b>	<b>153</b>
<b>ANEXO B - COMPROVANTE DE SUBMISSÃO ARTIGO 2.....</b>	<b>169</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 A ESQUIZOFRENIA E O SURGIMENTO DOS ANTIPSICÓTICOS

A esquizofrenia é um transtorno neuropsiquiátrico grave que é diagnosticado principalmente através da ocorrência do primeiro episódio psicótico, que ocorre predominantemente, na adolescência ou início da idade adulta, com pico entre 20 e 25 anos no homem e entre 25 e 30 anos na mulher. No entanto, este transtorno é frequentemente precedido por uma fase prodrômica (BAKHSHI; CHANCE, 2015; CORDIOLI et al., 2014; KAHN et al., 2015). Essa fase ocorre, de 1 a 10 anos antes da manifestação do primeiro episódio psicótico, e consiste em um declínio na função social e cognitiva (KAHN et al., 2015). É um transtorno crônico e complexo que pode ter causas multifatoriais e variados fatores de risco como genéticos, ambientais e relacionados ao desenvolvimento. Apesar dos estudos e esforços a etiologia permanece desconhecida (OWEN; SAWA; MORTENSEN, 2016).

Em termos epidemiológicos, segundo estimativas apresentadas no Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais V (DSM-V), do inglês, *Diagnostic and Statistical Manual fifth-edition*, a prevalência da esquizofrenia ao longo da vida é de 0,3 a 0,7% embora haja variações entre países, diferentes etnias e origem geográfica de imigrantes (CORDIOLI et al., 2014).

Os principais sintomas da esquizofrenia são divididos em dois grupos. Sintomas positivos, que incluem a ocorrência de delírios e alucinações e, sintomas negativos, que incluem a ocorrência de expressão emocional diminuída e avolia (falta de vontade, de iniciativa e de motivação) (CORDIOLI et al., 2014).

O Quadro 1 apresenta uma síntese das principais características que definem os transtornos psicóticos de acordo com o DSM-V. Para o diagnóstico de esquizofrenia, entre outros quesitos, é necessário a presença de dois ou mais dos 5 sintomas clínicos descritos no Quadro 1 por um período de um mês (ou menos, se tratados com sucesso). Pelo menos um dos cinco sintomas deve ser delírio, alucinação ou discurso desorganizado (CORDIOLI et al., 2014).

Há várias hipóteses que discutem quais seriam as principais causas da esquizofrenia incluindo a presença de alterações estruturais e neurofisiológicas do sistema nervoso central (SNC), a ação de fatores ambientais em especial a ocorrência de infecções, que poderiam afetar o neurodesenvolvimento durante a primeira infância. Além disso, pode haver a participação de fatores genéticos, como também, alterações no sistema de diferentes neurotransmissores como

o dopaminérgico, serotoninérgico e o glutamatérgico (KAHN et al., 2015; OWEN; SAWA; MORTENSEN, 2016).

Quadro 1 - Características essenciais que definem os transtornos psicóticos segundo o DSM V

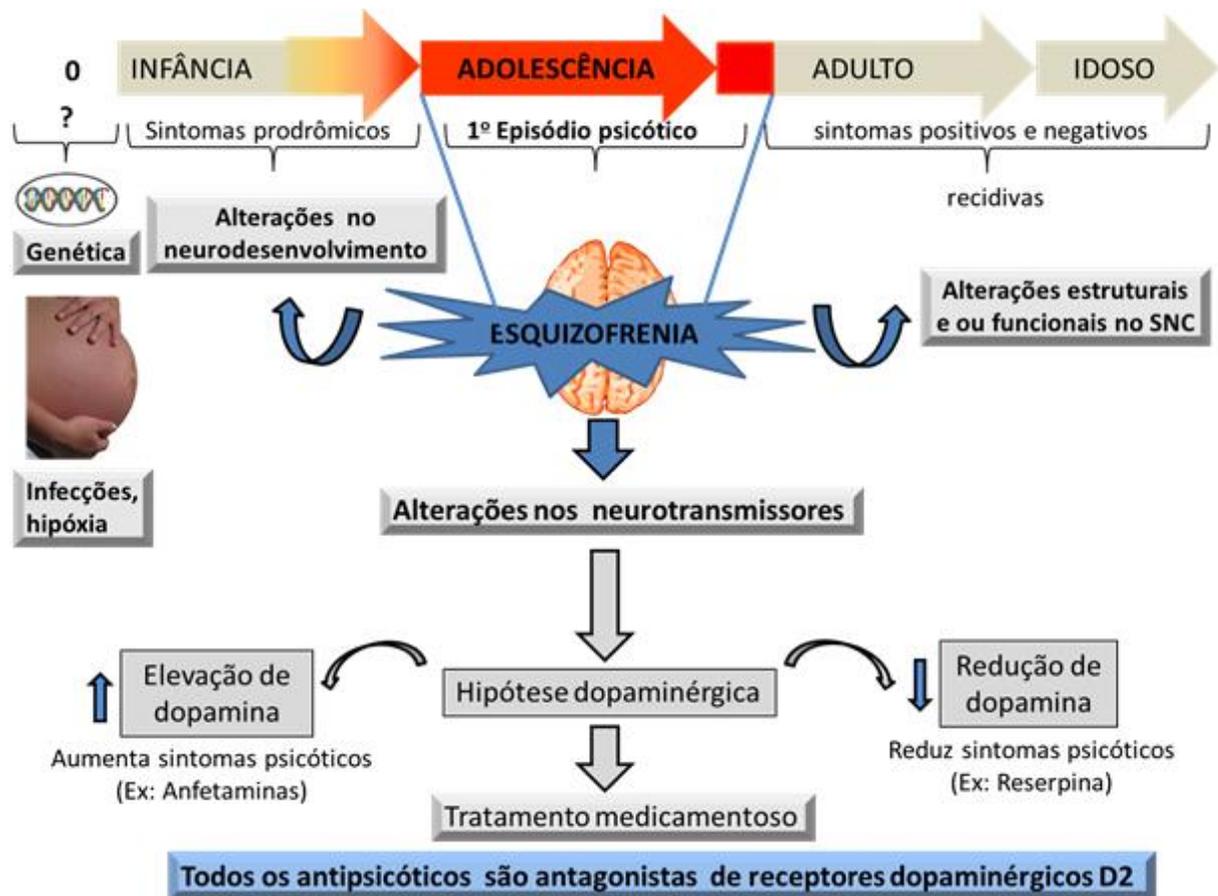
	SINTOMAS	CARACTERÍSTICAS / DESCRIÇÃO
1	Delírios	São crenças fixas, não passíveis de mudança à luz de evidências conflitantes. Seu conteúdo pode incluir uma variedade de temas (p. ex., persecutório, de referência, somático, religioso, de grandeza)
2	Alucinações	São experiências semelhantes à percepção que ocorrem sem um estímulo externo. São vívidas e claras, com toda a força e o impacto das percepções normais, não estando sob controle voluntário. Podem ocorrer em qualquer modalidade sensorial, embora as alucinações auditivas sejam as mais comuns na esquizofrenia e em transtornos relacionados
3	Discurso desorganizado	A <i>desorganização do pensamento (transtorno do pensamento formal)</i> costuma ser inferida a partir do discurso do indivíduo. Este pode mudar de um tópico a outro ( <i>descarrilamento ou afrouxamento das associações</i> ). As respostas a perguntas podem ter uma relação oblíqua ou não ter relação alguma ( <i>tangencialidade</i> ).
4	Comportamento motor desorganizado ou catatônico	Desde o comportamento “tolo e pueril” até a agitação imprevisível podem ser observados em qualquer forma de comportamento dirigido a um objetivo, levando a dificuldades na realização das atividades cotidianas.  <i>Comportamento catatônico</i> é uma redução acentuada na reatividade ao ambiente. Varia da resistência a instruções ( <i>negativismo</i> ), passando por manutenção de postura rígida, inapropriada ou bizarra, até a falta total de respostas verbais e motoras ( <i>mutismo e estupor</i> ).  Outras características incluem movimentos estereotipados repetidos, olhar fixo, caretas, mutismo e eco da fala
5	Sintomas Negativos	1 - <b>Expressão emocional diminuída:</b> inclui reduções na expressão de emoções pelo rosto, no contato visual, na entonação da fala (prosódia) e nos movimentos das mãos, da cabeça e da face, os quais normalmente conferem ênfase emocional ao discurso 2 - <b>Avolia:</b> é uma redução em atividades motivadas, autoiniciadas e com uma finalidade. A pessoa pode ficar sentada por períodos longos e mostrar pouco interesse em participar de atividades profissionais ou sociais

Fonte: Adaptado de Cordioli et al. (2014).

Desde a descoberta dos medicamentos antipsicóticos até os dias atuais, os principais fármacos usados para o tratamento da esquizofrenia são aqueles que atuam como antagonistas de receptores dopaminérgicos. O uso destes fármacos está baseado na chamada hipótese dopaminérgica que propõe que a hiperatividade dopaminérgica, na via mesolímbica, seria a principal responsável pelos sintomas positivos da doença. Por outro lado, uma hipofunção

dopaminérgica, na via mesocortical, seria responsável pelos sintomas negativos (KUMAR et al., 2017; MILLAN et al., 2014; MOREIRA; GUIMARÃES, 2007). Assim, a extensa maioria dos medicamentos antipsicóticos atuam como antagonistas de receptores dopaminérgicos reduzindo a suposta hiperativação dopaminérgica responsável pelos sintomas positivos (KUMAR et al., 2017; MILLAN et al., 2014). A Figura 1 resume a evolução da esquizofrenia ao longo da vida, as principais hipóteses desencadeadoras do transtorno e a associação da hipótese dopaminérgica com os antipsicóticos.

Figura 1 - Principais características e hipóteses da esquizofrenia. O transtorno apresenta etiologia desconhecida e surge principalmente na adolescência e início da idade adulta. As principais hipóteses envolvem: Genética, ambiente, neurodesenvolvimento, estrutura e função do SNC e neurotransmissores. Antipsicóticos atuam como antagonistas de receptores dopaminérgicos (D2)



Fonte: O autor (2019), informações retiradas de Kumar et al. (2017), Millan et al. (2014) e Moreira e Guimarães (2007).

O tratamento da esquizofrenia tem evoluído neste último século a partir da identificação e desenvolvimento dos chamados fármacos antipsicóticos de primeira e segunda geração.

### 1.1.1 Antipsicóticos de primeira geração

Antes da década de 50, os recursos terapêuticos para o tratamento da esquizofrenia eram muito limitados e incluíam a contenção física, coma insulínico, convulsoterapia e uso de fármacos sedativos incluindo hidrato de cloral e barbitúricos (ADAMS, 2014; BRASLOW, 1999). Entretanto, uma nova era foi iniciada quando em 1950, a molécula da clorpromazina foi sintetizada a partir da prometazina. É interessante destacar que, inicialmente tal fármaco foi desenvolvido por ter importantes efeitos anti-histamínicos em pacientes pré-operatórios. Posteriormente, a clorpromazina passou a ser utilizada em pacientes psiquiátricos agitados que demonstraram considerável melhora sintomática (BAN, 2007; BENNETT, 1998).

A partir da descoberta da clorpromazina, outros fármacos como o haloperidol foram desenvolvidos e originaram uma nova classe de medicamentos chamados antipsicóticos de primeira geração (APG) ou típicos. Estes fármacos revolucionaram o tratamento da esquizofrenia pois atuavam diretamente na redução dos sintomas positivos da doença como é o caso dos delírios e alucinações (BAN, 2007; BENNETT, 1998).

Apesar da clorpromazina ter sido introduzida em 1952 no tratamento da esquizofrenia, foi somente em 1963 que Arvid Carlsson e Margit Lindqvist propuseram o potencial mecanismo de ação deste fármaco. Este se daria através do bloqueio de receptores “monoaminérgicos”. Esta hipótese acabou revolucionando o entendimento da atuação de medicamentos psicotrópicos na neurotransmissão (BAUMEISTER, 2013). Experimentos posteriores confirmaram a relação entre a capacidade de ligação dos antagonistas (afinidade) de receptores de dopamina e dose terapêutica do medicamento (SEEMAN et al., 1976).

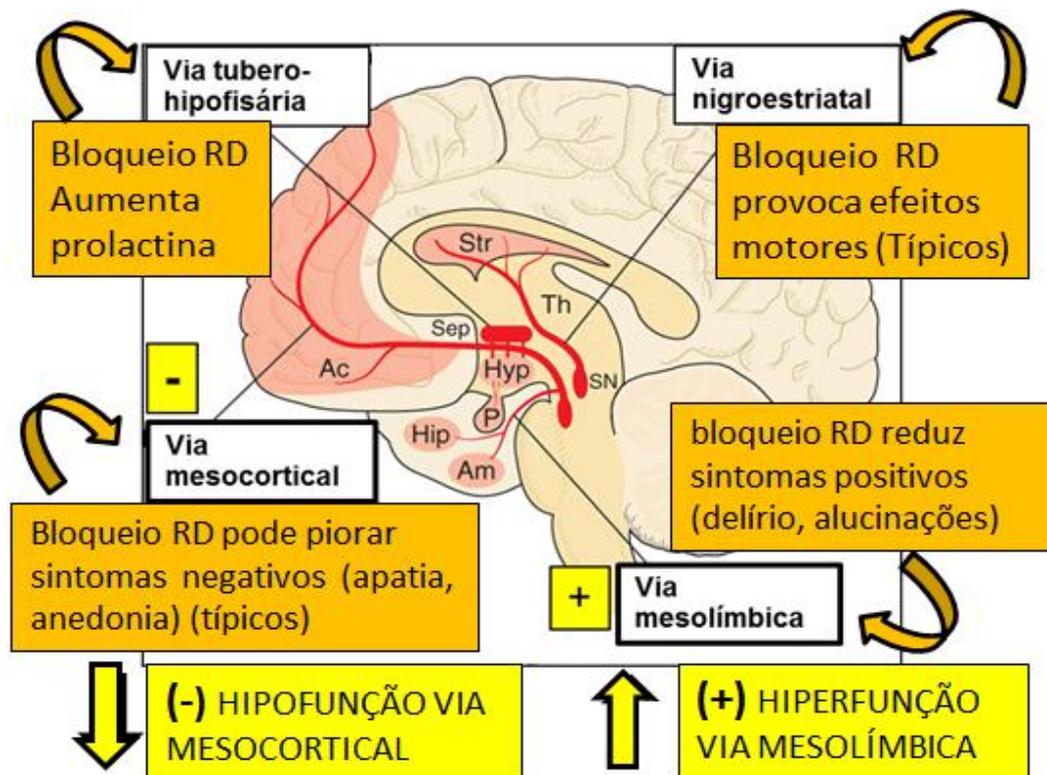
#### 1.1.1.1 Mecanismos de ação

Atualmente, são conhecidos diversos receptores de dopamina, todos eles acoplados a proteína G, sendo eles D1 e D5, cujo mecanismo de transdução é a ativação da adenilato ciclase, e D2, D3 e D4, que inibem a adenilato ciclase. Postula-se que a ação dos antipsicóticos deve-se, principalmente, mas não exclusivamente, ao antagonismo de receptores D2 (MOREIRA; GUIMARÃES, 2007).

Assim, a teoria dopaminérgica considera a hipótese de que, no paciente esquizofrênico, projeções para o lobo pré-frontal do córtex cerebral (via meso-cortical) apresentam hipofunção ocasionando os efeitos negativos (embotamento afetivo) (BENNETT, 1998). Por outro lado, a via dopaminérgica “meso-límbico-cortical” que origina-se da área tegmental ventral e se

projeta para o núcleo acúmbens (via mesolímbica) está hiperativa (ou com maior sensibilidade a dopamina) acarretando os sintomas positivos (delírios e alucinações). Portanto, a ligação de fármacos antagonistas de receptores D2 dessa via irá diminuir essa hiperatividade, reduzindo sintomas positivos (delírios e alucinações) (KUMAR et al., 2017; MOREIRA; GUIMARÃES, 2007) (Figura 2). No entanto, o antagonismo de receptores de dopamina em outras vias dopaminérgicas poderá ocasionar efeitos adversos indesejados (MOREIRA; GUIMARÃES, 2007) (Figura 2).

Figura 2 - Esquema geral do bloqueio de receptores de dopamina (RD) nas vias dopaminérgicas por APG e seus principais efeitos neurofisiológicos e nas manifestações clínicas da esquizofrenia



Fonte: O autor (2019), informações retiradas de Baumeister (2013), Kumar et al. (2017), Moreira e Guimarães (2007) e Owen, Sawa e Mortensen (2016).

Cabe ressaltar que uma crítica a esse modelo é o fato de que o antipsicótico, ao ser administrado, antagoniza os receptores dopaminérgicos assim que for absorvido e ser transportado para o SNC. No entanto, os efeitos terapêuticos relacionados a redução dos sintomas psicóticos, começam a fazer efeito, no mínimo, em duas semanas. Assim, é provável que ocorra um processo neuroadaptativo após a antagonização dos receptores por longo

período, envolvendo alteração do número de receptores, outros circuitos neuronais e outros neurotransmissores (KUMAR et al., 2017; MOREIRA; GUIMARÃES, 2007; OWEN; SAWA; MORTENSEN, 2016).

### *1.1.1.2 Efeitos adversos*

Apesar da sua eficácia no controle das manifestações da esquizofrenia, os APG apresentam diversos efeitos adversos indesejáveis. Entre estes, os principais e, mais graves, incluem a ocorrência de alterações psicomotoras, também conhecidas como efeitos extrapiramidais como a bradicinesia, acatisia e parkinsonismo. Em um percentual menor, em pacientes que fazem uso por anos, pode ocorrer discinesia tardia que é caracterizada por movimentos involuntários irreversíveis dos membros e da face, mesmo com a descontinuação da medicação (WERNER; COVEÑAS, 2014).

Esses efeitos são resultados diretos do antagonismo de receptores dopaminérgicos na via nigroestriatal (caudado-putamen, nos núcleos da base), que envolve o “sistema extrapiramidal” envolvido no controle motor. Além disso, podem ocorrer efeitos endócrinos, como o aumento da prolactina, pelo bloqueio de receptores dopaminérgicos na via túbero-hipofisária (BENNETT, 1998) (Figura 2).

Como os APGs também atuam antagonizando outros receptores como os histamínicos, muscarínicos,  $\alpha$ -adrenérgicos eles podem acarretar outros efeitos adversos incluindo sonolência, boca seca, constipação, hipotensão, entre outros (WERNER; COVEÑAS, 2014).

## 1.2 ANTIPSICÓTICOS DE SEGUNDA GERAÇÃO

Os estudos farmacológicos conduzidos em ratos e em pacientes que faziam uso de APG levaram a crença de que os efeitos extrapiramidais eram características inerentes desses fármacos e necessárias para a obtenção dos efeitos terapêuticos (BAN, 2007; MOREIRA; GUIMARÃES, 2007). No entanto, uma nova classe de medicamentos, chamados de antipsicóticos de segunda geração (ASG) ou atípicos, iriam revolucionar essa concepção estabelecida e dissociar os efeitos motores extrapiramidais dos efeitos terapêuticos.

O primeiro medicamento desse marco histórico da evolução dos antipsicóticos foi a clozapina (STEPHENS, 1990). Apesar de ter sido sintetizada em 1958 e sua eficácia clínica comprovada em 1962, a clozapina era vista com ceticismo pois não apresentava os efeitos extrapiramidais característicos dos antipsicóticos típicos, nos modelos animais e em humanos,

por isso, o termo “atípico” (STEPHENS, 1990). Somente em 1972 a clozapina conseguiu licenciamento comercial como antipsicótico na Europa. No entanto, em 1975, um relato de 8 casos de agranulocitose provocada pela clozapina, na Finlândia, retirou a clozapina de circulação em vários países e diminuiu o interesse de estudos científicos e clínicos pelo fármaco (IDANPAAN-HEIKKILA et al., 1975; VERA et al., 2012).

No final da década de 80, estudos sugeriram que a agranulocitose seria reversível com a descontinuação do fármaco e, principalmente, que a clozapina também apresentava eficácia em pacientes esquizofrênicos refratários a outros antipsicóticos. Assim, em 1990, a clozapina foi liberada pela agência sanitária norte-americana *Food Drug Administration* (FDA). Posteriormente, este fármaco passou a ser comercializado no âmbito mundial, para o tratamento da esquizofrenia refratária. Até hoje, continua sendo o fármaco de referência para esses casos (VERA et al., 2012).

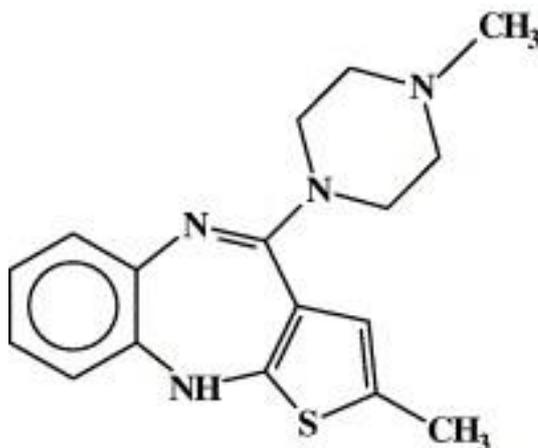
A partir do reconhecimento da eficácia da clozapina para o tratamento de pacientes psiquiátricos sem acarretar efeitos extrapiramidais, uma nova fronteira de estudos se estabeleceu, permitindo o desenvolvimento de novos fármacos atípicos incluindo a quetiapina, amissulprida, ziprasidona, risperidona e olanzapina, entre outros. Por apresentarem menor risco de provocar agranulocitose em comparação com a clozapina, esses fármacos passaram a ser utilizados para o tratamento da esquizofrenia (não refratária), como também no tratamento de outras doenças psiquiátricas, como transtorno bipolar (KIRKHAM et al., 2017; MOREIRA; GUIMARÃES, 2007; STURM et al., 2018; VERA et al., 2012).

### **1.2.1 Olanzapina**

A olanzapina (OLZ) é um antipsicótico atípico desenvolvido pela indústria farmacêutica Eli Lilly a partir de modificações estruturais da clozapina (Figura 3). Este fármaco despertou interesse clínico em função de resultados obtidos em estudos que mostraram uma eficácia da OLZ similar a clozapina no tratamento da esquizofrenia com menor risco de desencadear os efeitos extrapiramidais (BENNETT, 1998; KOMOSSA et al., 2010). Em 1996, a OLZ recebeu o licenciamento para comercialização nos Estados Unidos e Europa por ter menor risco de indução de agranulocitose do que a clozapina (CAVALLA, 2000). Inicialmente aprovada para tratamento de curto prazo dos episódios maníacos do transtorno afetivo bipolar e para tratamento de manutenção, a longo prazo, da esquizofrenia (GRUNZE et al., 2018; MALONEY; SIKICH, 2010). Posteriormente a OLZ foi aprovada também para o tratamento

de episódios agudos de esquizofrenia e episódios maníacos mistos associados ao transtorno bipolar I em pacientes adolescentes (GRUNZE et al., 2018; WINGÅRD et al., 2017).

Figura 3 - Estrutura química da olanzapina



Fonte: Wawrzycka-Gorczyca et al. (2007).

No Brasil, a OLZ, por ser um medicamento de alto custo, faz parte dos medicamentos excepcionais e está na lista de “Componente Especializado da Assistência Farmacêutica”. Esse medicamento é distribuído gratuitamente pelo Ministério da Saúde, em comprimidos de 5mg ou 10mg, a partir de protocolos estabelecidos para a sua disponibilização. É importante destacar que o uso da OLZ também requer acompanhamento médico especializado e exames periódicos (devido ao risco de agranulocitose) (BRASIL, 2014).

#### 1.2.1.1 Mecanismos de ação da OLZ

A OLZ tem afinidade para muitos receptores neuronais incluindo dopamina D<sub>1</sub>-D<sub>5</sub>,  $\alpha_1$  - adrenoreceptores, receptores de histamina H<sub>1</sub>, receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2B</sub>, 5-HT<sub>2C</sub>, 5-HT<sub>3</sub> e 5-HT<sub>6</sub> e receptores muscarínicos M<sub>1-5</sub>. O principal mecanismo de ação proposto para a OLZ e para os demais ASG é a ação antagonista em receptores D<sub>2</sub> e serotoninérgicos 5-HT<sub>2A</sub>. Além disso, o perfil terapêutico “atípico” parece estar relacionado a uma baixa afinidade para receptores D<sub>2</sub> e uma rápida capacidade de dissociação de receptor D<sub>2</sub> (NAKAJIMA et al., 2016).

Essas informações trouxeram um desafio para o entendimento do funcionamento desses fármacos, já que todos os estudos mostravam que era necessária a ocupação de receptores de D<sub>2</sub> na via mesolímbica para os efeitos terapêuticos. Estudos com neuroimagem envolvendo

vários antipsicóticos mostraram que o efeito terapêutico ocorre com a ocupação de 65% a 80% dos receptores. Ocupações inferiores não apresentaram ação terapêutica e, superiores, estavam associadas ao desencadeamento de efeitos extrapiramidais (NAKAJIMA et al., 2016). Esses resultados confirmaram que o efeito terapêutico poderia ser dissociado do efeito adverso extrapiramidal. Além disso, acredita-se que a menor afinidade e, especialmente, a dissociação rápida, possam explicar o menor efeito extrapiramidal dos ASG (MOREIRA; GUIMARÃES, 2007; NAKAJIMA et al., 2016) (Figura 4).

Da mesma forma, a ocupação na via nigroestriatal acarretaria os efeitos extrapiramidais e na via túbero-hipofisária acarretaria os efeitos hormonais de liberação de prolactina. No entanto, essas vias liberam, naturalmente, mais dopamina do que a via mesolímbica e a dopamina liberada pode ser capaz de competir e deslocar o antagonista do receptor, já que ele possui menor afinidade e uma alta taxa de dissociação. Assim, haveria uma taxa de ocupação menor, mantendo o funcionamento normal da via mesolímbica, sem os efeitos adversos motores relacionados a via nigroestriatal (MOREIRA; GUIMARÃES, 2007; NAKAJIMA et al., 2016).

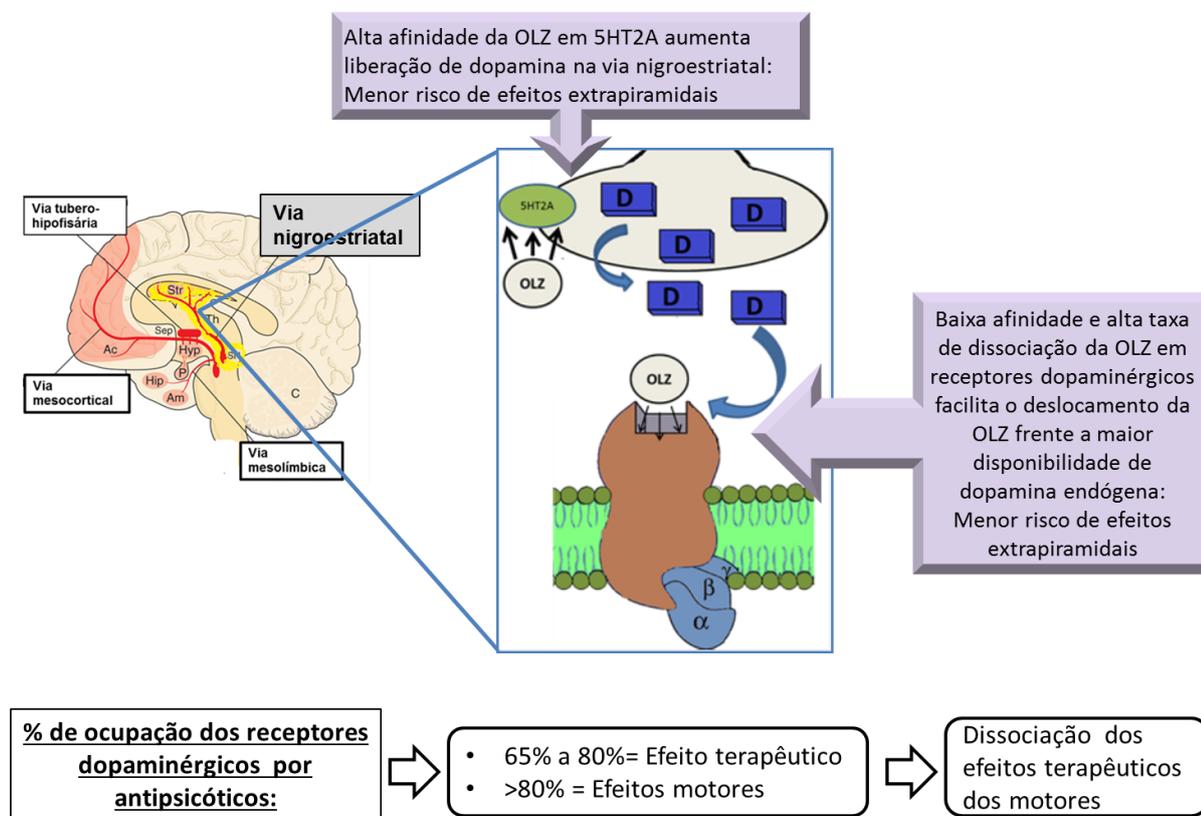
Adicionalmente, uma hipótese em relação aos receptores 5-HT<sub>2A</sub> é que, ao serem antagonizados, indiretamente, estimulam a liberação de dopamina, especialmente, na via nigroestriatal que tem uma densidade maior desses receptores do que a via mesolímbica, contribuindo para impedir a ocupação dos receptores pela OLZ nessas vias (MELTZER; MASSEY, 2011; MOREIRA; GUIMARÃES, 2007; NAKAJIMA et al., 2016) (Figura 4).

Esses mecanismos ainda não foram totalmente desvendados e há estudos sugerindo a participação de outros subtipos de receptores serotoninérgicos (5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>6</sub> ou 5-HT<sub>7</sub>) na modulação envolvendo as vias dopaminérgicas (MELTZER; MASSEY, 2011; MOREIRA; GUIMARÃES, 2007)

Apesar da complexidade dos mecanismos envolvidos, a Figura 4 resume esquematicamente as diferenças de afinidade da OLZ nos receptores de dopamina D2 e de serotonina 5HT<sub>2A</sub>, e a relação com o menor risco de desenvolver sintomas motores extrapiramidais.

Um novo entendimento surgiu a partir dos ASG, possibilitando o aprofundamento de pesquisas para o desenvolvimento de novos fármacos antipsicóticos.

Figura 4 - Alta afinidade da OLZ com receptores 5HT2A e baixa com D2. Dissociação entre efeitos motores e efeitos terapêuticos da OLZ



Fonte: O autor (2019), informações retiradas de Meltzer e Massey (2011), Moreira e Guimarães (2007) e Nakajima et al. (2016).

### 1.2.1.2 Efeitos adversos

Embora a OLZ apresente efeitos extrapiramidais reduzidos ou mesmo ausentes dependendo da dose administrada, este fármaco pode induzir outros efeitos adversos incluindo aumento de prolactina. A OLZ também pode induzir sonolência, boca seca e hipotensão ortostática, provavelmente pelo antagonismo de receptores de histamina (H-1), muscarínicos e  $\alpha_1$ -adrenoreceptores. Por outro lado, a OLZ tem apresentado um menor risco de desenvolver agranulocitose comparado com a clozapina (WERNER; COVEÑAS, 2014).

No entanto, um conjunto de efeitos adversos altamente indesejáveis diz respeito a indução de alterações metabólicas da OLZ que podem aumentar o risco de doenças cardiovasculares nos pacientes. Estas alterações incluem ganho de peso, maior risco de obesidade, risco de diabetes, risco de desenvolver síndrome metabólica (CHIU et al., 2010; WERNER; COVEÑAS, 2014). Esses efeitos adversos podem ocorrer em maior ou menor grau

nos ASG, mas a clozapina e a OLZ são as que mais apresentam riscos de ganho de peso e síndrome metabólica quando comparados com os demais ASG (CHIU et al., 2010).

### 1.3 ASG E SUA RELAÇÃO COM GANHO DE PESO E DISTÚRBIOS METABÓLICOS

Evidências epidemiológicas produzidas a partir de estudos realizados na Suécia (CRUMP et al., 2013) e EUA (OLFSON et al., 2015) apontaram que pacientes com esquizofrenia tiveram mortalidade marcadamente prematura em relação a população em geral. Ambos estudos também relataram que a causa mais frequente de mortalidade destes pacientes foi a doença cardíaca. Esta associação parece estar diretamente relacionada com alterações metabólicas ocasionadas pela administração de ASG incluindo a OLZ. De fato, vários estudos têm descrito a associação entre o uso de ASG com o aumento de peso e distúrbios metabólicos que aumentam o risco de desenvolvimento da obesidade, dislipidemias, diabetes mellitus e doenças cardiovasculares (ARTERBURN et al., 2016; GAUTAM; MEENA, 2011; LEE; CHOW; LEUNG, 2011; LIEBERMAN et al., 2005; SUBRAMANIAM, 2014).

#### 1.3.1 ASGs e o ganho de peso

A associação entre o uso de ASG e ganho de peso é bem consistente e baseada na análise de grandes grupos populacionais. Por exemplo, um estudo de Arterburn et al. (2016) analisou as bases de dados de dois grandes sistemas de saúde dos Estados Unidos (EUA), no período de 2004 a 2011, e descreveu uma associação significativa entre o uso de ASG e o ganho de peso. O estudo estimou que após um ano de tratamento, a média de ganho de peso chegou a 10kg para usuários de ASG. Essa associação parece não ter especificidade étnica, como mostrou um estudo envolvendo 973 pacientes esquizofrênicos chineses com uso de antipsicóticos que detectou uma predominância de sobrepeso de 58% e, de obesos, de 73,6% em relação ao grupo controle (SUBRAMANIAM, 2014).

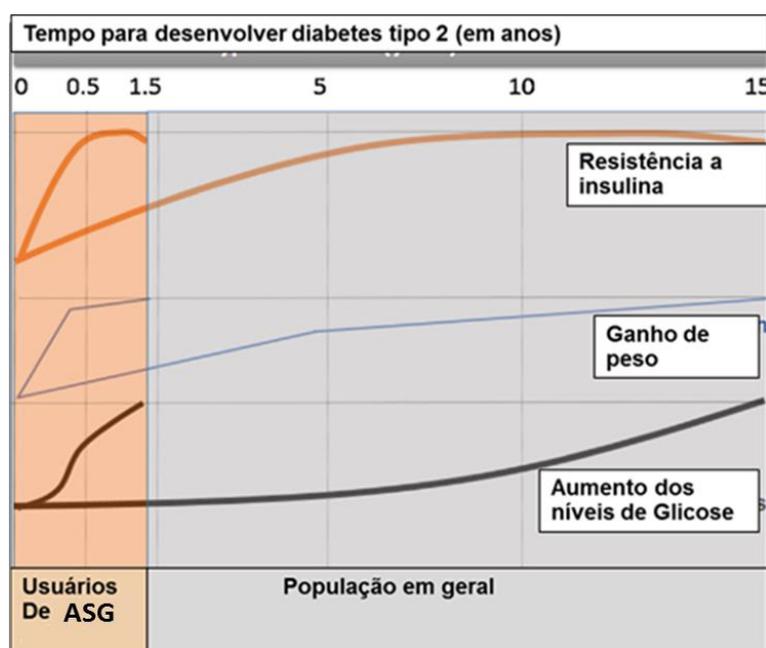
Considerando os diferentes tipos de antipsicóticos utilizados, o tratamento com a OLZ foi o que apresentou a maior associação com o risco de obesidade. Infelizmente, os mecanismos causais dessa associação ainda não estão totalmente esclarecidos e são de grande interesse científico. Investigações relatadas na revisão feita por Hirsch et al. (2017) sobre o tema têm mostrado que há diferenças entre os antipsicóticos com relação ao maior ou menor risco de obesidade, sendo a clozapina e a OLZ, nessa ordem, os que mais apresentam ganho de peso. Esta sugestão foi fortemente baseada em um ensaio clínico randomizado e duplo-cego

conduzido em 2005 denominado *Clinical Antipsychotic Trials of Intervention Effectiveness* (CATIE). Tal estudo acompanhou 1493 pacientes esquizofrênicos, por 18 meses, comparando eficácia, efeitos adversos e taxas de abandono dos antipsicóticos OLZ, quetiapina, risperidona e ziprasidona. Nesse estudo, a OLZ foi a que apresentou maior ganho de peso e alterações de marcadores glicêmicos e do metabolismo lipídico (LIEBERMAN et al., 2005).

Resultados de uma meta-análise com pacientes esquizofrênicos, mostraram um ganho de peso no tratamento com clozapina de 4,45 kg, OLZ de 4,15 kg, risperidona de 2,10kg e ziprasidona de 0,04kg (ALLISON et al., 1999) que tem sido confirmada por outras investigações (revisão em Hirsch et al. (2017). Outra revisão sobre o tema, desenvolvida por Dayabandara et al. (2017) destacaram que o peso aumenta rapidamente no período inicial após o uso dos antipsicóticos como a OLZ. Entretanto, os pacientes continuam a ganhar peso a longo prazo, sendo as crianças particularmente mais vulneráveis ao ganho de peso induzido por tais fármacos.

A Figura 5 mostra, esquematicamente, como os pacientes tratados com ASG apresentam, em menos de um ano e meio, alterações de resistência a insulina, ganho de peso e aumento dos níveis de glicose equivalente a pacientes de diabetes tipo 2 que levam de 10 a 15 anos para desenvolver as mesmas alterações.

Figura 5 - Representação esquemática do tempo para desenvolver alterações metabólicas em indivíduos tratados com ASG e pacientes diabéticos tipo 2



### 1.3.2 Alterações metabólicas desencadeadas pelos ASGs

Revisões de literatura têm mostrado que o uso cada vez maior de ASG pode provocar não somente o aumento de peso e risco de obesidade, mas também, doenças metabólicas associadas como o diabetes e maior risco de doenças cardiovasculares (COCCURELLO; MOLES, 2010; GONÇALVES; ARAÚJO; MARTEL, 2015; ROJO et al., 2015).

De fato, um estudo comparando parâmetros metabólicos entre pacientes que fazem uso de APG e ASG mostrou que, após 4 meses, os ASG apresentaram maiores alterações dos parâmetros metabólicos e 11,66% dos pacientes desenvolveram síndrome metabólica. Dentre os antipsicóticos estudados, a OLZ foi a que apresentou maior potencial para causar síndrome metabólica (GAUTAM; MEENA, 2011). Um estudo semelhante, com pacientes com esquizofrenia chineses, comparou o uso de ASG (risperidona, OLZ e ziprasidona) com APG (clorpromazina, haloperidol e trifluoperazina). Como resultado, a OLZ apresentou maior associação com a piora do perfil metabólico induzindo elevação dos níveis de triglicéridios, de LDL-colesterol e diminuição nos níveis de HDL-colesterol (LEE; CHOW; LEUNG, 2011). Os estudos sugeriram que as alterações iniciais de parâmetros metabólicos provocadas pelos ASG podem aumentar o risco do surgimento de dislipidemias e síndromes metabólicas. Uma revisão sistemática sobre o tema incluiu 13 estudos com um total de 185.105 adolescentes com uso de ASGs. Comparado com controles saudáveis, o risco cumulativo de desenvolvimento de diabetes mellitus do tipo 2 foi 2,58 vezes maior nos jovens tratados com estes fármacos. Os autores comentaram que o tratamento com a OLZ e o tempo de exposição a antipsicóticos foram os principais fatores de risco modificáveis para o desenvolvimento de diabetes mellitus do tipo 2 em jovens expostos a antipsicóticos. Por este motivo, o estudo sugeriu que antipsicóticos devem ser usados criteriosamente e pelo menor tempo necessário em pessoas jovens, e sua eficácia e segurança devem ser monitoradas proativamente (GALLING et al., 2016).

Vários estudos têm mostrado que essas alterações ocasionadas pelos ASG podem ocorrer de forma muito mais rápida já nas primeiras semanas de uso. Este é o caso da investigação conduzida por Chiu et al. (2010) que descreveu que pacientes esquizofrênicos ao usarem OLZ pela primeira vez, após 8 semanas, apresentaram um ganho significativo de peso, aumento dos níveis de triglicéridios, colesterol total e lipoproteína de baixa densidade (LDL). A fim de excluir possíveis fatores relacionados a esquizofrenia que poderiam contribuir com o aumento de peso e alterações metabólicas, Albaugh et al. (2011) realizaram um estudo do tipo duplo cego, randomizado e controlado por placebo no qual foi ministrado 10mg de OLZ, durante três dias em voluntários saudáveis. Como resultado, alguns marcadores bioquímicos

como glicose, leptina, triglicerídios, entre outros, apresentaram-se aumentados indicando que tal efeito adverso é dependente apenas do fármaco e não da doença psiquiátrica *per se*. Outro estudo com voluntários saudáveis, no qual receberam uma única dose de 10mg de OLZ obteve como resultado um aumento da glicemia em jejum, diminuição do cortisol sérico, aumento de prolactina. Outros parâmetros bioquímicos também foram alterados pela exposição a OLZ. Deste modo, parece que a OLZ altera processos bioquímicos envolvendo glicose, metabolismo lipídico e níveis hormonais, mesmo após uma única administração (HAHN et al., 2013).

Na tentativa de esclarecer como a OLZ age no metabolismo energético celular, Vestri et al. (2007) realizaram um estudo *in vitro* utilizando células embrionárias de ratos da linhagem celular 3T3-L1 diferenciadas em adipócitos que foram expostas a diferentes concentrações de OLZ, clozapina e risperidona. O estudo avaliou o efeito destes fármacos na taxa de transporte de glicose estimulada pela insulina. Os ASG clozapina e OLZ, que possuem maior risco de ganho de peso e síndrome metabólica, afetaram significativamente a ação da insulina e o metabolismo dos adipócitos induzindo distúrbios na lipólise e também alterando a lipogênese. Os autores postularam que estas influências estariam relacionadas com o efeito adverso que leva a distúrbios cardiometabólicos. O conjunto de outras investigações confirmou que os ASG, em especial a clozapina e a OLZ, desregulam a homeostase do tecido adiposo, aumentando a lipogênese, induzindo diferenciação/hiperplasia, secreção de mediadores inflamatórios e resistência à insulina (GONÇALVES; ARAÚJO; MARTEL, 2015). Como consequência, essas alterações podem impactar na expectativa de vida do paciente. De fato, estudos indicam uma expectativa de vida reduzida para pacientes esquizofrênicos em relação a maioria da população (LAURSEN; NORDENTOFT; MORTENSEN, 2014; SALVO et al., 2016).

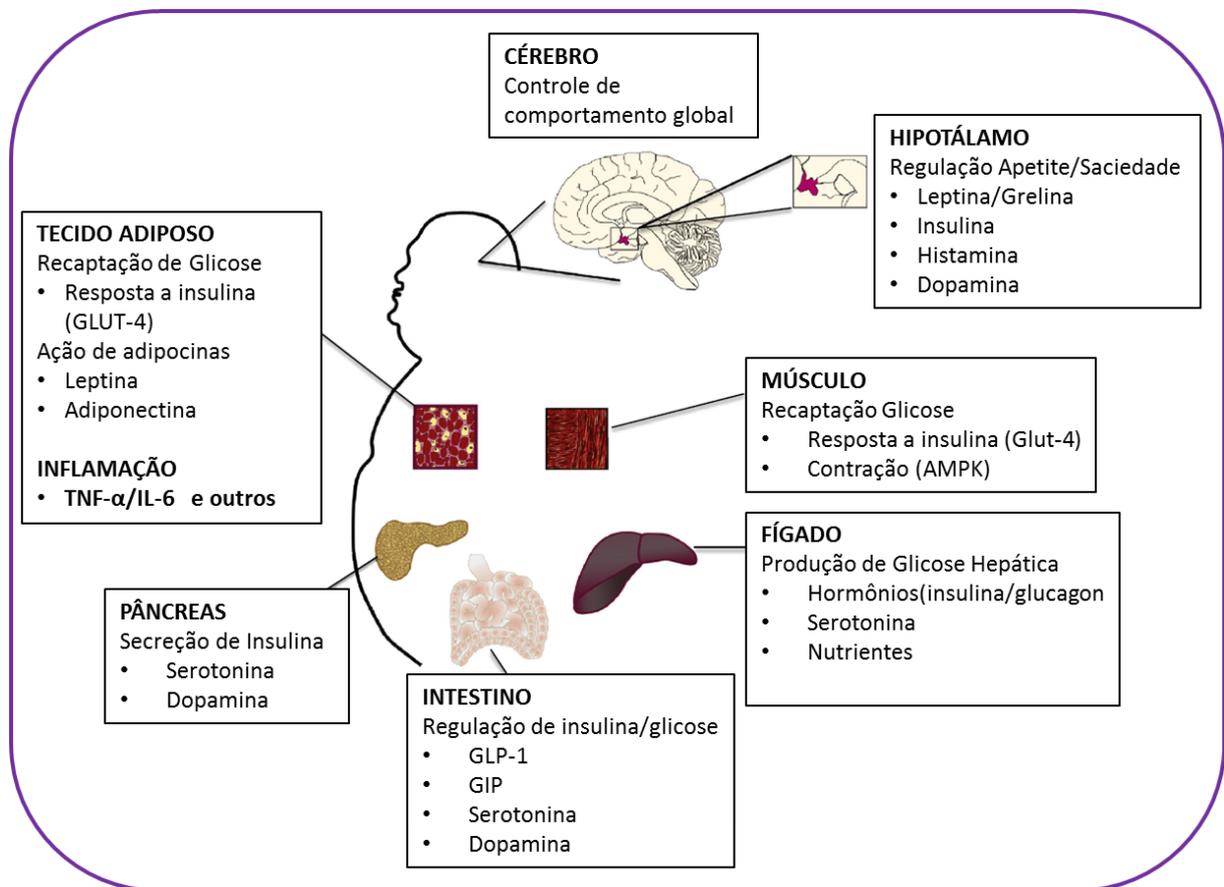
### **1.3.3 Mecanismos propostos**

Diante dessas informações, vários mecanismos têm sido propostos para explicar o ganho de peso e as alterações metabólicas. Uma revisão mais abrangente (BALLON et al., 2014) abordou diferentes aspectos da fisiopatologia dos antipsicóticos nos efeitos metabólicos. Nessa revisão, as hipóteses das ações dos antipsicóticos relacionam o controle da regulação do apetite/saciedade, alteração hormonal, resistência à insulina e aumento dos níveis de marcadores inflamatórios (TNF- $\alpha$ , IL-6) com o envolvimento de diferentes órgãos e tecidos como o pâncreas, fígado, músculo, SNC, entre outros (Figura 6).

Apesar dos mecanismos desses efeitos adversos ainda não serem totalmente conhecidos, parece que as alterações de processos inflamatórios e oxidativos provocados por esses

medicamentos são elementos chaves no desencadeamento de distúrbios metabólicos e da própria síndrome metabólica (SÁRVÁRI et al., 2014; VICTORIANO et al., 2010). Essa hipótese baseia-se em pesquisas que têm mostrado que um processo oxidativo/inflamatório pode estar envolvido em mecanismos desencadeadores da obesidade e síndrome metabólica, envolvendo a participação de macrófagos e citocinas inflamatórias (CILDIR; AKINCILAR; TERGAONKAR, 2013; WEISBERG et al., 2003).

Figura 6 - Possíveis alvos dos antipsicóticos no organismo na disfunção metabólica



Fonte: Adaptado de Ballon et al. (2014).

## 1.4 ASG E O METABOLISMO OXIDATIVO

### 1.4.1 Metabolismo oxidativo

A mitocôndria é uma organela celular responsável pela produção da principal fonte energética da célula, a adenosina trifosfato (ATP). Em condições fisiológicas, a mitocôndria produz ATP a partir de reações bioquímicas que envolvem oxigênio e glicose que são moléculas chaves nas rotas bioquímicas incluindo o sistema de cadeia de transporte de elétrons para a

produção de ATP. Esta organela também está envolvida no metabolismo do cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) e é fundamental em várias atividades celulares, como o ciclo celular (ATKIN et al., 2011; LIESA; SHIRIHAI, 2013; RIZZUTO et al., 2012; SANTO-DOMINGO; DEMAUREX, 2010; TWIG et al., 2008).

No entanto, no processo de síntese de ATP esta organela torna-se também, a principal fonte de produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). Assim, essas duas ações fazem da mitocôndria um importante componente do funcionamento e homeostase celular (MALKUS; TSIKA; ISCHIROPOULOS, 2009; STRECK; CZAPSKI; SILVA, 2013).

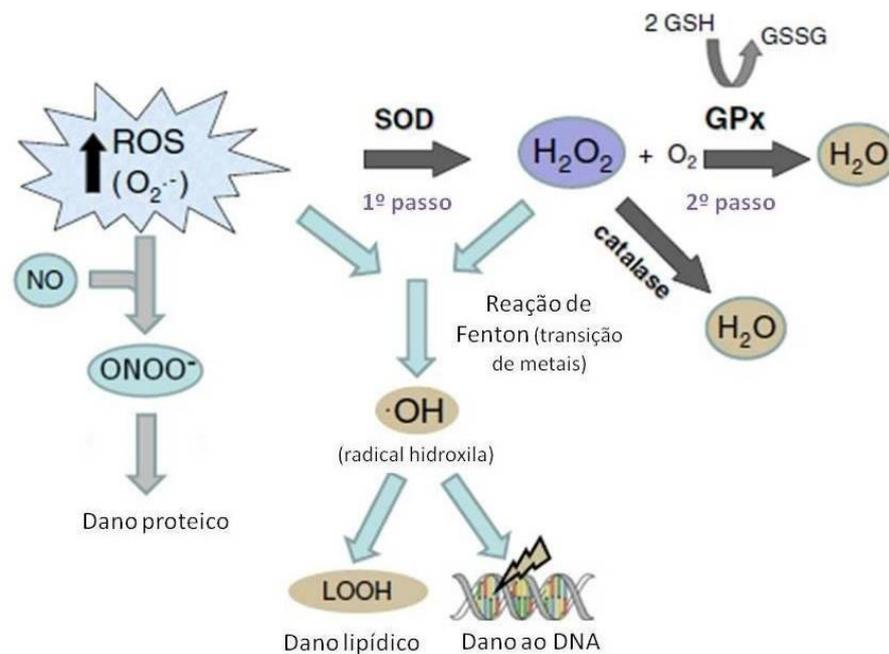
A teoria quimiosmótica proposta por Peter Mitchell em 1961 e aceita até os dias de hoje considera que o substrato de oxidação e síntese de ATP são indiretamente acoplados através de uma força gradiente ou protonmotiva que ocorre na membrana mitocondrial interna. O processo de produção de APP envolve a ATP sintase mitocondrial (F-ATP sintase) que é uma enzima localizada na membrana interna da mitocôndria cuja função está intimamente relacionada com a cadeia respiratória mitocondrial. Tal enzima catalisa a síntese de moléculas de ATP, através do processo de fosforilação oxidativa. Ou seja, para se dar a fosforilação do ADP em ATP é necessário que ocorra uma oxidação, que neste caso passa pela utilização de NADH ou FADH<sub>2</sub> na cadeia respiratória mitocondrial. Essa reação ocorre via gasto de energia que é liberada durante o transporte de elétrons. Os carreadores de elétrons participam de quatro complexos mitocondriais até que ocorra a produção de ATP (revisão em Cadenas (2018)).

Entretanto, a fosforilação oxidativa é incompletamente acoplada, uma vez que os prótons podem vazar através da membrana mitocondrial interna e retornar à matriz mitocondrial sem que ocorra síntese de ATP. Essa translocação de prótons para o espaço intermembranoso aparentemente ocorre em todas as células eucarióticas (revisão em Cadenas (2018)). Deste modo, aproximadamente 5% do oxigênio que ingressou se transforma em uma molécula com menos dois elétrons na última camada atômica conhecida como ânion superóxido ( $\text{O}^{-2}$ ). Essa molécula é uma espécie reativa de oxigênio (ROS) que pode gerar outras moléculas desbalanceadas de oxigênio que são consideradas subprodutos tóxicos de metabolismo aeróbico e a principal causa de danos macromoleculares (CADENAS, 2018). Contudo, quando produzidos de maneira controlada, as EROs desempenham importantes papéis funcionais sendo também importantes mecanismos de defesa do organismo contra a invasão de patógenos ou a limpeza de células mortas presentes em tecidos lesionados. Algumas EROs, como o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e o óxido nítrico (ON) também atuam como sinalizadores celulares de proliferação, migração, sobrevivência e diferenciação celular. Além destas funções o ON é uma

molécula chave no processo fisiológico de vasodilatação do sistema cardiovascular (MACHADO et al., 2015; PERL, 2013).

Por serem moléculas relevantes ao organismo o controle da produção de EROs é altamente refinado sendo conduzido por um sistema enzimático antioxidante endógeno e pelo ingresso de moléculas antioxidante exógenas geralmente obtidas via dieta. No sistema antioxidante enzimático o radical  $O_2^{\bullet-}$ , produzido na mitocôndria, é dismutado pela ação da enzima superóxido dismutase dependente de manganês ( $SOD_2$ ) a  $H_2O_2$  (Figura 7). Esta espécie intermediária de oxigênio, na mitocôndria é então catalisada em água e oxigênio pela enzima glutathiona peroxidase (GPx). No citoplasma o  $H_2O_2$  também é catalizado em água pela ação da enzima catalase (CAT) (GOLDSTEIN; MEYERSTEIN; CZAPSKI, 1993; KIRKINEZOS; MORAES, 2001; VALKO et al., 2007).

Figura 7 - Atuação de enzimas antioxidantes e efeitos dos radicais livres



Fonte: Adaptado de Rosenfeldt et al. (2013).

Entretanto, níveis especialmente elevados de  $H_2O_2$  produzidos pela mitocôndria podem se deslocar para o citoplasma, e neste local reagir com metais de transição, especialmente o  $Fe^{2+}$ , produzindo o radical hidroxila ( $OH^\bullet$ ) (reação de Fenton). No caso,  $OH^\bullet$  é uma molécula altamente reativa com grande potencial genotóxico já que possui grande afinidade ao DNA causando quebras e mutações nesta molécula. O  $OH^\bullet$  também é capaz de causar lipoperoxidação

e carbonilação de proteínas induzindo assim disfunções celulares importantes (KIRKINEZOS; MORAES, 2001; VALKO et al., 2007).

Adicionalmente ao sistema antioxidante enzimático celular, formado principalmente pela SOD, GPx e pela catalase (CAT), há o sistema antioxidante não-enzimático, o qual também possui a capacidade de se ligar diretamente a EROs transformando estas moléculas em água (H<sub>2</sub>O). Desta forma moléculas antioxidantes tem a capacidade de prevenir possíveis danos celulares. A maior parte de tais moléculas bioativas são encontradas em frutos e vegetais, ainda que algumas moléculas antioxidantes como a glutathiona possam ser sintetizadas pelo organismo (LU, 2013). Dessa forma, indivíduos que apresentam hábitos alimentares mais saudáveis possuem potencialmente uma resposta antioxidante mais eficaz frente a possíveis desbalanços oxidativos e ao chamado estresse oxidativo (FITÓ et al., 2007; RODRIGO; GUICHARD; CHARLES, 2007; VICENT; INNES; VINCENT, 2007).

#### **1.4.2 ASG e sua relação com o estresse oxidativo**

Estudos experimentais sugerem que algumas doenças neuropsiquiátricas estão relacionadas à disfunção mitocondrial, envolvendo a dinâmica mitocondrial, o metabolismo do Ca<sup>2+</sup> e a expressão de genes mitocondriais e nucleares vinculados à estrutura mitocondrial (BRENNER-LAVIE et al., 2008; MURALEEDHARAN et al., 2015). Tanto indivíduos com esquizofrenia quanto com transtorno bipolar, por exemplo, apresentam alterações oxidativas por deficiência na atividade mitocondrial, com consequente aumento do estresse oxidativo, danos proteicos, lipídicos e genéticos, comprometendo a homeostase celular. Por outro lado, a deficiência mitocondrial e maior nível de estresse oxidativo identificados em pacientes esquizofrênicos tem gerado controvérsia se a origem seria relacionada a doença ou ao tratamento medicamentoso com antipsicóticos (MURALEEDHARAN et al., 2015; SCAINI et al., 2018).

De fato, estudos com pacientes esquizofrênicos e com transtorno bipolar que ainda não haviam recebido a medicação, mostraram maior nível de estresse oxidativo. Por outro lado, pacientes que não eram esquizofrênicos ou bipolares, apresentavam níveis oxidativos esperados (normais). Entretanto, indicadores de estresse oxidativo representados pelo aumento de moléculas oxidadas também foram identificados após o uso desta medicação. Esses resultados foram confirmados em modelos animais mostrando que vários ASG, como a OLZ e a clozapina, têm a capacidade de aumentar os níveis de marcadores oxidativos em pacientes e em animais. Por outro lado, vários estudos *in vitro* tem mostrado efeitos neuroprotetores dos ASG em

modelos envolvendo neurotoxicidade provocada por disfunção mitocondrial (BAIG et al., 2010; FEHSEL et al., 2005).

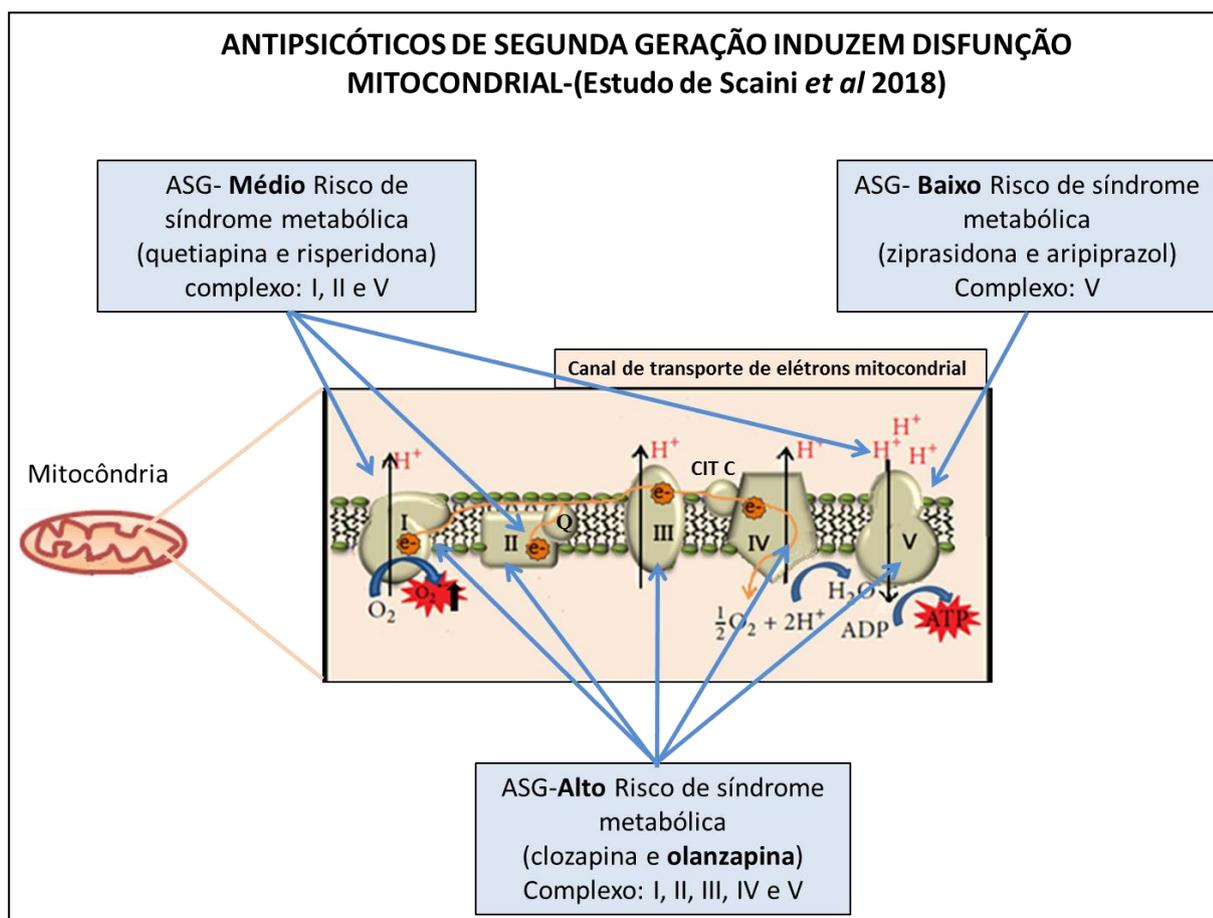
Em 2007, Tan et al. descreveram diferenças de efeitos neuroprotetores induzidos por fármacos APG e ASG. Quando células de linhagem PC-12 derivadas de um feocromocitoma da medula suprarrenal de rato, foram expostas a rotenona que causa disfunção mitocondrial via inibição do complexo I mitocondrial, a administração de ASG, como a OLZ, apresentou um efeito neuroprotetor ao diminuir a morte celular. No entanto, nesse mesmo modelo, o APG haloperidol aumentou a resposta de morte neuronal induzida pela rotenona. Já em outros modelos *in vitro* expostos ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e a MPP<sup>+</sup> (neurotoxina que atua interferindo na fosforilação oxidativa na mitocôndria pela inibição do complexo I), dopamina ou peptídeo β-amilóide os APG também mostram efeitos neuroprotetores (GASSÓ et al., 2012; LEE et al., 2010; MAGLIARO; SALDANHA, 2009; PARK et al., 2011). Entretanto, parece que o efeito neuroprotetor é dependente do tipo de célula. Por exemplo, um estudo conduzido por Magliaro e Saldanha (2009) descreveu que a exposição ao ASG clozapina apresentou efeito protetor frente ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> apenas na linhagem de células PC-12. Entretanto, este efeito não foi observado em neurônios da linhagem SH-SY5Y.

Aqui é importante ressaltar que os estudos descritos, envolveram linhagens celulares neuronais expostas a um agressor neurotóxico e, portanto, modelos buscando detectar alguma propriedade neuroprotetora do antipsicótico frente a um agente neurotóxico. No entanto, no estudo de Vucicevic et al. (2014), células neuronais da linhagem SH-SY5Y exposta a OLZ, sem nenhuma substância neurotóxica associada, mostrou um aumento da autofagia das mesmas. No caso, a OLZ pareceu provocar a autofagia por meio do estresse oxidativo levando a uma “limpeza” da disfunção mitocondrial e prevenção do dano neuronal, evitando a apoptose. No entanto, ao usar uma substância inibidora da autofagia, ocorreu neurotoxicidade. Ou seja, sem a autofagia o aumento de EROs provocou morte celular. Portanto, a relação entre ação do antipsicótico, produção de EROs e disfunção mitocondrial parece ser complexa e fatores que possam modular essas respostas merecem ser investigados.

Nesse sentido, recentemente, estudo de Scaini et al. (2018) sugeriu que a associação entre o uso de atipsicóticos com alto risco de desenvolver síndrome metabólica (Clozapina e OLZ) está relacionado com a indução da disfunção mitocondrial. Nesse estudo, foram coletadas células mononucleares de sangue periférico (CMSPs) de pacientes esquizofrênicos tratados com medicamentos antipsicóticos com baixo (ziprasidona e aripiprazol), médio (quetiapina e risperidona) e alto risco (clozapina e OLZ) de desenvolver síndrome metabólica. Nos pacientes que eram tratados com fármacos de baixo risco, a expressão gênica referente a subunidade V

da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, estava diminuída. Nos antipsicóticos de médio risco a expressão gênica referente as subunidades I, II e V estavam diminuídas. Nos antipsicóticos de alto risco (clozapina e OLZ) todas as subunidades I, II, III, IV e V estavam diminuídas em relação ao controle (Figura 8).

Figura 8 - Antipsicóticos de segunda geração induzem disfunção mitocondrial



Fonte: O autor (2019), informações retiradas de Scaini et al. (2018).

Ainda nos estudos conduzidos por Scaini et al. (2018), linhagens celulares expostas diretamente aos antipsicóticos, *in vitro*, mostraram que os antipsicóticos de maior risco, como a OLZ, apresentavam redução de ATP, diminuição de atividade enzimática respiratória mitocondrial, menor consumo de oxigênio entre outros. Esses dados sugerem que os antipsicóticos de maior risco de desenvolver síndrome metabólica apresentam uma maior disfunção mitocondrial quando comparado com antipsicóticos que apresentam menor risco de desenvolver síndrome metabólica. Portanto, é possível que esses fármacos provoquem um

desequilíbrio do metabolismo oxidativo e assim, mesmo que parcialmente, contribuam com o desenvolvimento dos efeitos metabólicos (ELMORSY; SMITH, 2015; SCAINI et al., 2018)

## 1.5 ASSOCIAÇÃO ENTRE ASG, OBESIDADE E INFLAMAÇÃO

### 1.5.1 Sistema imune e inflamação

A inflamação é uma resposta de defesa do organismo desencadeada frente a um estímulo nocivo como infecção, injúria ou estresse. As respostas inflamatórias, locais ou sistêmicas, objetivam eliminar o estímulo desencadeador, promovendo a reparação do tecido e estabelecendo a memória imune. O sistema imunológico é o principal responsável pelas respostas de defesa do organismo frente a microrganismos invasores ou outros agentes nocivos, dividindo-se em imunidade inata e imunidade adaptativa ou adquirida (FULLERTON; GILROY, 2016).

O sistema imune inato é responsável por respostas imunológicas imediatas por meio de barreiras físicas, químicas e biológicas que são produzidas por células e moléculas especializadas. Estas respostas não dependem de contato prévio com um determinado agente patológico (memória imunológica). O sistema imune adquirido é mais complexo, pois envolve células (linfócitos) que irão desenvolver respostas imunológicas específicas a um determinado patógeno (CRUVINEL et al., 2010).

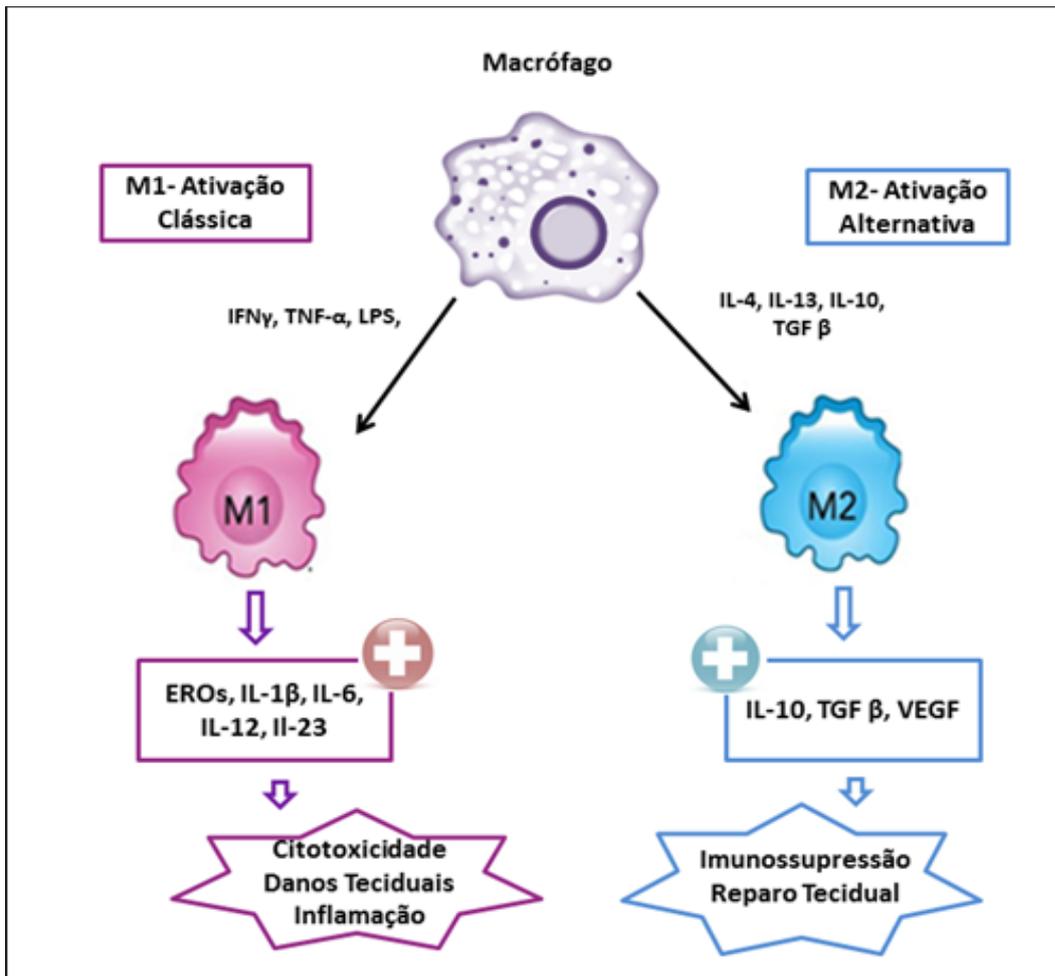
Nesse contexto, os monócitos/macrófagos têm papel relevante na regulação de processos inflamatórios agudos e crônicos. Os monócitos constituem 3% a 8% dos leucócitos circulantes e, no tecido conjuntivo ou parênquima de órgãos, dão origem a macrófagos e células dendríticas mieloides. Os monócitos presentes no sangue se originam dos pró-monócitos localizados na medula óssea. Quando ocorre algum tipo de invasão microbiana ou lesão tecidual, os monócitos deixam o sangue infiltrando-se em tecidos, sofrendo alterações citofisiológicas e passando a serem chamados de macrófagos. Os monócitos e macrófagos são fagócitos eficientes, engolfando patógenos e debris celulares. Além de seu papel na imunidade inata, processam e apresentam antígenos via moléculas do complexo de histocompatibilidade principal, MHC (do inglês, *Major Histocompatibility Complex*), estimulando assim, a resposta mediada por linfócitos T (CRUVINEL et al., 2010).

Os macrófagos estão presentes em praticamente todos os tecidos e são importantes células efetoras imunes. Eles não “percebem” apenas lesão e infecção, mas também outros tipos de condições nocivas como hipóxia e estresse metabólico. Além disso, cumprem muitas funções

tróficas que são essenciais para a manutenção dos tecidos, adaptação ao estresse e reparação tecidual (BRÜNE et al., 2013).

Os macrófagos apresentam uma dinâmica capacidade de mudança funcional em resposta aos sinais do microambiente, gerando duas subpopulações de macrófagos (M1 e M2) de acordo com a rota de ativação (Figura 9). Desta forma, nos processos inflamatórios, há a ativação da via clássica ou M1, em que os macrófagos secretam diversas citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$ , quimiocinas e fatores de crescimento. Além disso, atuam na modulação do metabolismo oxidativo pela produção de EROs como o  $O_2^-$ ,  $OH^-$ ,  $H_2O_2$  e intermediários reativos do nitrogênio, como o ON (CRUVINEL et al., 2010; ODEGAARD; CHAWLA, 2011). Por outro lado, na via alternativa ou M2, os macrófagos induzem o aumento de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10, e apresentam ação imunossupressora diminuindo a proliferação de linfócitos T (BRÜNE et al., 2013).

Figura 9 - Polarização de macrófagos. Rota M1 (ativação clássica) e M2 (ativação alternativa)



A ativação da via clássica ocorre em resposta aos produtos derivados ou associados a infecções bacterianas, como o lipopolissacarídeo (LPS) e interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), resultando em macrófagos altamente inflamatórios com alto potencial fagocítico e bactericida. Em contraste, a ativação alternativa ocorre em resposta a produtos derivados ou associados a infecções por parasitas que estão envolvidas na reparação e remodelação tecidual (ODEGAARD; CHAWLA, 2011).

Estudos *in vitro* mostraram que a ativação pelas vias M1 ou M2 pode ser polarizada, ou seja, direcionada, de acordo com os estímulos desencadeadores para determinada via. De fato, macrófagos cultivados *in vitro*, na presença de LPS ou IFN- $\gamma$ , são polarizados para a via clássica, gerando macrófago pró-inflamatório (M1). No entanto, quando cultivados na presença de IL-4, estas mesmas células desenvolvem um efeito anti-inflamatório (macrófago M2) (LACKEY; OLEFSKY, 2016). Portanto, a polarização de macrófagos para a via clássica ou alternativa, envolve mecanismos complexos que dependem do microambiente e de fatores endógenos/exógenos.

Nesse contexto, a resposta inflamatória envolvendo a ativação e polarização de macrófagos tem sido estudada e implicada nos mecanismos desencadeadores de algumas doenças, como a obesidade e distúrbios metabólicos (LACKEY; OLEFSKY, 2016).

### **1.5.2 Obesidade/síndrome metabólica e inflamação**

Até a década de 90, acreditava-se que o tecido adiposo tinha como função somente o armazenamento e fornecimento de ácidos graxos, conforme as necessidades energéticas do organismo. Com o avanço das pesquisas científicas sobre o tema, foram identificadas aproximadamente 50 moléculas biologicamente ativas que este tecido produz e secreta, denominadas adipocinas. Estas biomoléculas possuem funções variadas, conforme o tipo de tecido e órgão, como a leptina (LUMENG; SALTIEL, 2011; ZHANG et al., 2005), a adiponectina, o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), a resistina (LUMENG; SALTIEL, 2011; STEPPAN; LAZAR, 2004), a visfatina (FUKUHARA et al., 2005) e as citocinas IL-6 (LUMENG; SALTIEL, 2011; MOHAMED-ALI; PINKNEY; COPPACK, 1998) e a IL-1 $\beta$  (LUMENG; SALTIEL, 2011; TRAYHURN; WOOD, 2005). Assim, o tecido adiposo passou a ser também considerado como um órgão endócrino (LUMENG; SALTIEL, 2011).

Outros estudos demonstraram que o tecido adiposo possui um papel central na resposta imune inata, pois secreta uma variedade de peptídeos e hormônios relacionados a defesa corporal, especialmente, pela presença dos macrófagos residentes que produzem algumas

moléculas (citocinas) pró-inflamatórias e anti-inflamatórias (LACKEY; OLEFSKY, 2016; LUMENG; SALTIEL, 2011; ODEGAARD; CHAWLA, 2011). Um processo inflamatório crônico pode estar envolvido em mecanismos de obesidade e síndrome metabólica, com a participação de macrófagos e citocinas inflamatórias (CILDIR; AKINCILAR; TERGAONKAR, 2013; WEISBERG et al., 2003). Os primeiros indícios da relação entre obesidade e inflamação surgiram com estudos apontando um aumento dos níveis de TNF- $\alpha$  e citocinas pró-inflamatórias em tecido adiposo de ratos e humanos obesos (HOTAMISLIGIL; SHARGILL; SPIEGELMAN, 1993). Investigações posteriores mostraram que macrófagos poderiam infiltrar-se no tecido adiposo de ratos e humanos obesos, sendo a principal fonte de TNF- $\alpha$  e outras citocinas pró-inflamatórias (WEISBERG et al., 2003). Estima-se que o quantitativo de macrófagos no tecido adiposo possa variar entre 10% para magros (camundongos e humanos) e mais de 50% em obesos (WEISBERG et al., 2003).

Nesse contexto, acredita-se que na obesidade ocorre um processo inflamatório de baixo nível e crônico, com a migração de monócitos para o tecido adiposo e, localmente, ocorre ativação de macrófagos, com polarização para a via clássica, gerando macrófagos M1, responsáveis por liberação de citocinas inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$ ), EROS e ON (CILDIR; AKINCILAR; TERGAONKAR, 2013; LACKEY; OLEFSKY, 2016; LUMENG; SALTIEL, 2011; WEISBERG et al., 2003).

Pesquisas relacionando a obesidade e resistência à insulina têm implicado a participação de mediadores inflamatórios como demonstrado em um estudo *in vitro* com linhagem celular para o mediador pró-inflamatório TNF- $\alpha$  (HOTAMISLIGIL et al., 1996). Nesse sentido, foram analisados dois grupos de animais obesos, alimentados com uma dieta rica em gordura, sendo um grupo geneticamente modificado para não expressar TNF- $\alpha$ . Como resultado, o grupo de animais obesos knockout TNF- $\alpha$  não apresentou resistência a insulina, típica desse modelo. Além disso, nesses animais, o nível de ácidos graxos circulantes era bem menor em relação ao grupo obeso controle e igual a um grupo de ratos magros (HOTAMISLIGIL et al., 1996).

Os dados sugerem que, apesar da obesidade em ambos os grupos, o TNF- $\alpha$  pareceu modular mecanismos envolvidos com a resistência à insulina e o metabolismo lipídico, podendo ter relação com posterior propensão ao diabetes *mellitus 2* e dislipidemias (MRAZ; HALUZIK, 2014).

### 1.5.3 ASG e inflamação

Apesar dos mecanismos envolvidos não estarem totalmente esclarecidos, admite-se a participação de processos inflamatórios na fisiopatologia da obesidade (CILDIR; AKINCILAR; TERGAONKAR, 2013). Nesse sentido, alguns estudos têm buscado relacionar os efeitos adversos como o ganho de peso e alterações metabólicas provocadas pelo uso de ASG, como a OLZ, com estados inflamatórios crônicos de baixo grau que poderiam ser provocados por essas medicações (DUARTE et al., 2018; SÁRVÁRI et al., 2014; VICTORIANO et al., 2010; ZHANG et al., 2014b).

Em 2010, um estudo com ratas tratadas com haloperidol e OLZ, mostrou que a OLZ causou aumento da expressão de TNF- $\alpha$  com infiltração generalizada de macrófagos para o tecido adiposo (VICTORIANO et al., 2010). Seguindo essa linha, Zhang et al. (2014b) trataram ratas com OLZ e avaliaram marcadores metabólicos e inflamatórios. Os resultados mostraram ganho de peso e aumento dos níveis de triglicerídios. Além disso, a OLZ apresentou uma regulação positiva da expressão de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, juntamente com infiltração de macrófagos e aumento do tamanho médio dos adipócitos. Assim, os resultados deste estudo indicam que a inflamação induzida pela OLZ e a adiposidade estão intimamente relacionadas (ZHANG et al., 2014a).

Conforme Sárvári et al. (2014), os ASG aumentaram a expressão dos genes pró-inflamatórios e adipogênicos em uma cultura de células de pré-adipócitos. Os resultados mostraram que os antipsicóticos exibiram um pronunciado efeito de *upregulation* em genes envolvidos na regulação do ciclo celular, na indução do fator de transcrição NF- $\kappa$ B em adipócitos, incluindo citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8 e MCP-1 (do inglês, *Monocyte Chemoattractant Protein-1*).

Para Da Cruz Jung et al. (2016), o ASG risperidona foi capaz de, *in vitro*, ativar linhagens de macrófagos RAW 264.7, apresentando respostas inflamatórias. Houve aumento dos níveis de óxido nítrico (ON), diminuição da viabilidade celular por indução a apoptose, aumento de citocinas inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ ) e diminuição da citocina anti-inflamatória (IL-10). Esse estudo mostrou que, além de modular o aumento da expressão de citocinas inflamatórias, a risperidona também poderia modular mecanismos apoptóticos e provocar um desbalanço no metabolismo oxidativo com uma maior produção de espécies reativas de oxigênio (EROs).

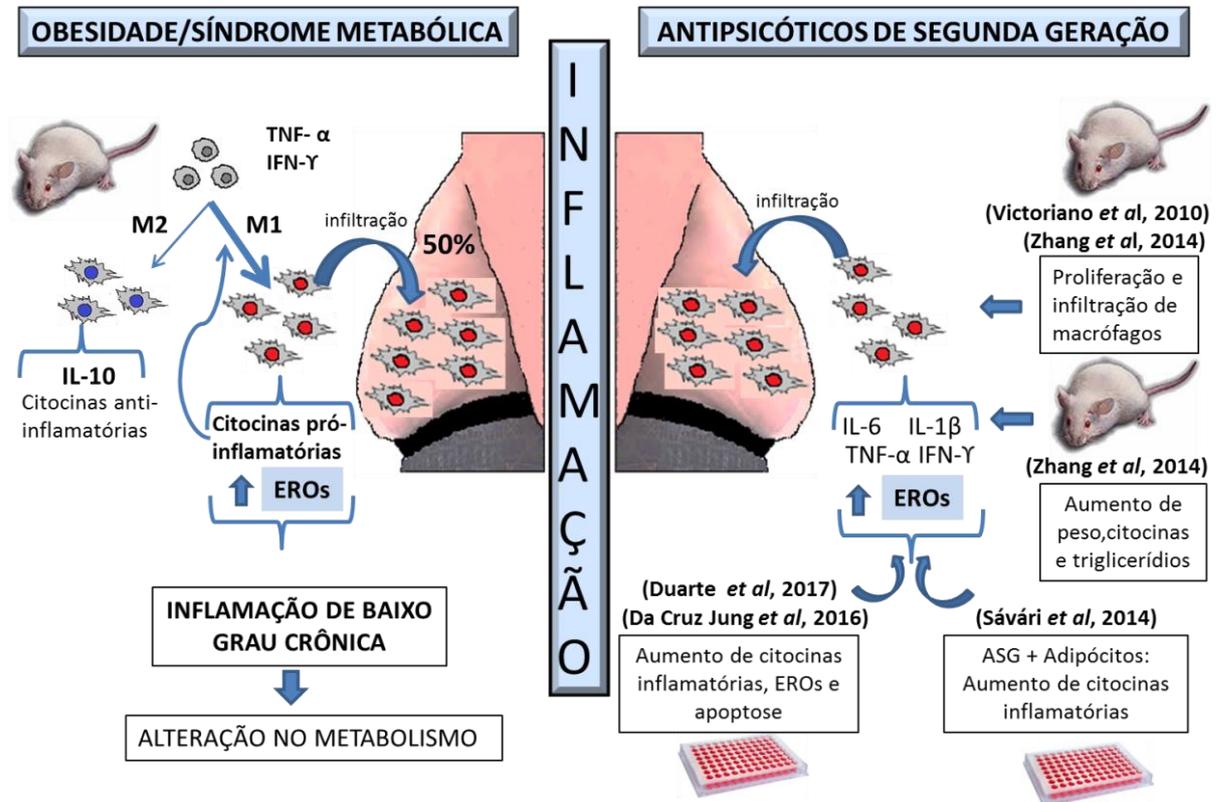
Duarte et al. (2018) demonstraram que em células macrofágicas não inflamadas, a exposição ao ASG ziprasidona, causou aumento da proliferação celular e aumento nos níveis

de moléculas oxidantes envolvidas na resposta inflamatória (óxido nítrico, superóxido, EROs) e citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ). A exposição a ziprasidona também causou queda nos níveis da IL-10, citocina antiinflamatória. Em conjunto, esses dados sugerem que a ziprasidona poderia produzir uma resposta inflamatória periférica, e essa resposta pode explicar a resposta alérgeno-inflamatória observada em alguns pacientes tratados com este antipsicótico.

O significado dos estudos descritos, em conjunto, sugere que a inflamação desencadeada pelos ASG, especialmente a OLZ, pode ser um fator relevante nos mecanismos envolvidos para o surgimento dos efeitos adversos relacionados ao ganho de peso e síndrome metabólica.

A Figura 10 resume esquematicamente a similaridade da resposta inflamatória relacionada a obesidade/síndrome metabólica e o uso de ASG. Em ambos os casos há ganho de peso, ativação de macrófagos, infiltração de macrófagos, especialmente no tecido adiposo, produção de citocinas inflamatórias e produção de EROS. Em conjunto, em ambos os casos há produção de um processo oxidativo e inflamatório crônico de baixo grau. Estudos *in vivo* e *in vitro*, indicam que as alterações oxidativas e inflamatórias podem ocorrer antes do ganho de peso e das alterações metabólicas (ALBAUGH et al., 2011; HAHN et al., 2013; VESTRI et al., 2007). Entretanto, os estudos com ASG envolvendo a resposta inflamatória são ainda incipientes. Na presente revisão não foram encontrados estudos, até o momento, que tenha avaliado, *in vitro*, a exposição da OLZ a linhagem celular de macrófagos raw 264.7.

Figura 10 - Vias comuns de inflamação entre a obesidade/síndrome metabólica e a provocada pelos ASG



Fonte: O autor (2019), informações retiradas de Cildir, Akincilar e Tergaonkar (2013), Da Cruz Jung et al. (2016), Duarte et al. (2018), Lumeng e Saltiel (2011), Sávári et al. (2014), Victoriانو et al. (2010), Weisberg et al. (2003) e Zhang et al. (2014a; 2014b).

## 1.6 INTERRELAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO E INFLAMAÇÃO E A MODULAÇÃO POR FATORES EXÓGENOS

Apesar dos processos envolvendo inflamação e estresse oxidativo serem complexos, podem ocorrer interrelações. A maior produção de EROs pode provocar agressões a sítios proteicos, organelas, danos ao DNA (do inglês, *Deoxyribonucleic acid*) e membranas celulares e, desta forma, contribuir com a manutenção de processos inflamatório (PERL, 2013), como também, com a polarização de macrófagos M1 pró-inflamatórios (BARBISAN, 2017). Por outro lado, processos inflamatórios podem estar gerando estresse oxidativo, com aumento da produção de EROs (BARBISAN, 2017).

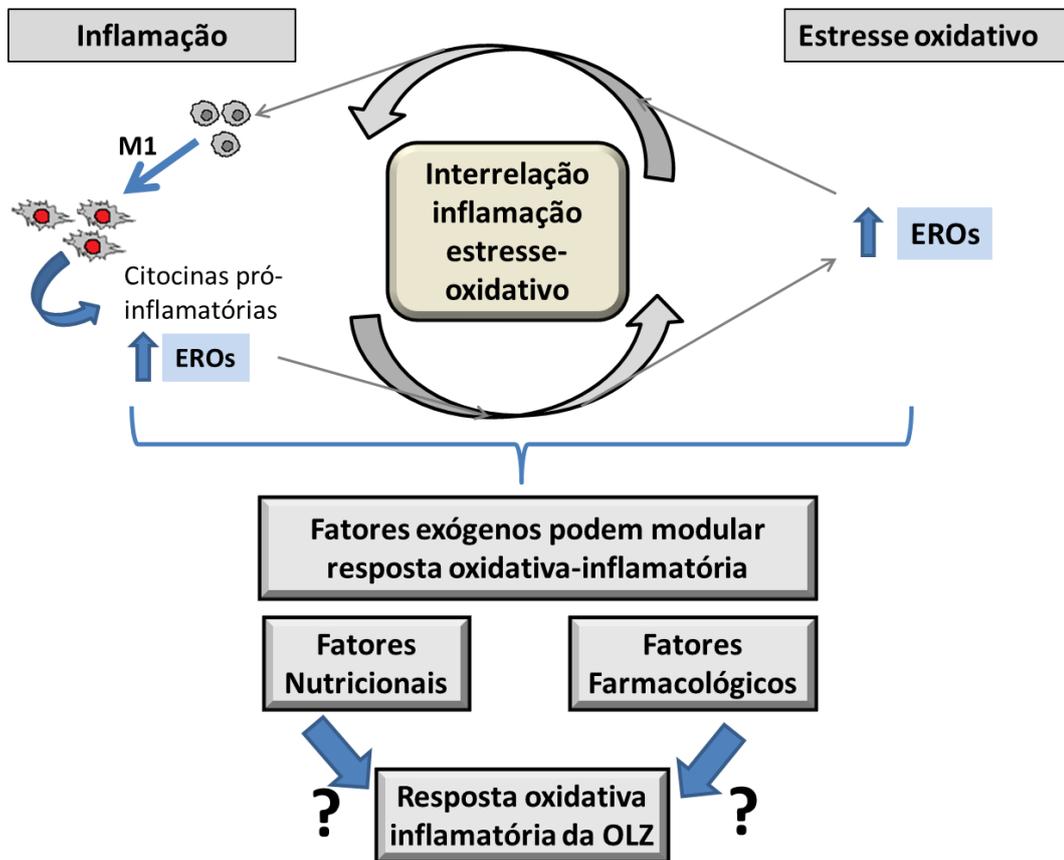
Vários estímulos podem desencadear tanto respostas inflamatórias crônicas como estresse oxidativo como por exemplo, alimentos pró-oxidantes, infecções, obesidade, como

também, vários fármacos (BARBIZAN, 2017) incluindo, antipsicóticos de segunda geração, como a OLZ (SCAINI, 2018).

Pesquisadores tem estudado o estresse oxidativo e a inflamação (ação oxi-inflamatória) em diferentes fármacos, avaliando a influência de fatores nutricionais, genéticos e farmacológicos na modulação oxi-inflamatória (BARBISAN, 2017; BARBISAN et al., 2014, 2017, 2018; DUARTE et al., 2016, 2018). Nesse sentido, estudos com o polimorfismo da Superóxido Dismutase (SOD<sub>2</sub>), enzima antioxidante envolvida no equilíbrio do metabolismo oxidativo, tem mostrado diferenças de respostas na modulação oxi-inflamatória em vários medicamentos (BARBISAN et al., 2014, 2017; DUARTE et al., 2016). Da mesma forma, estudos envolvendo interação medicamentosa, tem apontado influência na modulação antiinflamatória do lítio por antidepressivos (BARBISAN et al., 2017, 2018a). Em relação a influência nutricional, estudos tem mostrado que compostos bioativos podem influenciar a ação oxi-inflamatória de fármacos (BARBISAN, 2017; BARBISAN et al., 2017; DUARTE et al., 2018).

Cabe ressaltar que não há nenhum estudo com a OLZ sobre a influência de fatores nutricionais ou farmacológicos na modulação oxi-inflamatória. Essa questão é relevante considerando as implicações do estado oxi-inflamatório crônico do paciente que faz uso contínuo da medicação. Em relação a aspectos nutricionais, uma alimentação rica em compostos bioativos antioxidantes poderiam atuar diretamente no estresse oxidativo. Em relação a interação medicamentosa, avaliar o comportamento oxi-inflamatório de determinada interação pode ser relevante, futuramente, na decisão clínica. A Figura 11 mostra a ação da OLZ no estresse oxidativo e inflamação e a questão em aberta sobre a influência de fatores nutricionais ou farmacológicos na modulação oxi-inflamatória.

Figura 11 - Interrelação entre estresse oxidativo e inflamação. Possibilidade de fatores nutricionais e farmacológicos poderem influenciar na modulação oxi-inflamatória da OLZ



Fonte: O autor (2019), informações retiradas de Barbisan (2017), Barbisan et al. (2018a) e Duarte et al. (2018).

### 1.7 LÍTIU, UM ESTABILIZADOR DO HUMOR, COM AÇÃO MODULADORA OXIDATIVA – ANTI-INFLAMATÓRIA

Pacientes com transtorno bipolar apresentam episódios recorrentes de mania e depressão, mas a etiologia da doença ainda não está completamente esclarecida. Geralmente os indivíduos com transtorno bipolar têm um componente genético que interage com o meio ambiente para desenvolver a doença. Segundo o DSM-V a prevalência de Transtorno Bipolar I em 12 meses estimada nos EUA é de 0,6% e em 11 países varia de 0,0 a 0,6% (DSM-V). Para transtorno bipolar II a prevalência em 12 meses, nos EUA é de 0,8% e, internacionalmente é de 0,3% (CORDIOLI et al., 2014). Atualmente, a farmacoterapia para transtorno bipolar envolve estabilizadores do humor e ASG incluindo a OLZ (CIPRIANI; RENDELL; GEDDES, 2010; GRUNZE et al., 2018; WINGÅRD et al., 2017).

Em 1949, John Cade introduziu o lítio como um tratamento eficaz para a mania, e desde então, tornou-se a farmacoterapia clássica para transtorno bipolar. O lítio tem um efeito antimaniaco consolidado e ação profilática contra a recorrência de episódios afetivos. Além disso, o lítio está associado à redução da morte por suicídio entre pacientes bipolares. No entanto, o lítio tem uma janela terapêutica estreita que necessita de monitorização rigorosa da sua concentração plasmática (LÓPEZ-MUÑOZ et al., 2018).

O mecanismo subjacente à eficácia terapêutica do lítio como estabilizador de humor não é totalmente compreendido. Várias hipóteses foram sugeridas para explicar seu mecanismo de ação, incluindo depleção dos níveis de inositol no cérebro; modulação da via de sinalização cAMP; inibição do glicogênio sintase quinase GSK-3 $\beta$ ; participação no metabolismo oxidativo, modulação da transmissão serotoninérgica, bem como outras sinalizações moleculares e vias celulares que são afetadas pelo lítio (MALHI; OUTHRED, 2016; NASSAR; AZAB, 2014). Assim, enquanto o lítio tem uma ampla gama de efeitos farmacológicos, não está claro qual deles é mais relevante para a sua eficácia terapêutica.

### **1.7.1 O lítio e o metabolismo oxidativo**

Algumas pesquisas demonstraram que o transtorno bipolar é associado com deficiência do complexo mitocondrial I e pode diminuir a produção de ATP e aumentar a produção de EROs (MACHADO et al., 2016). Consequentemente, as células apresentam estresse seguido por diferentes danos celulares, incluindo peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e danos no DNA. O cérebro é um dos tecidos mais afetados pela disfunção mitocondrial devido à sua alta sensibilidade ao estresse oxidativo e demandas de energia para neurotransmissão (AKARSU et al., 2014). Desta forma, a disfunção mitocondrial altera diretamente parâmetros envolvendo estresse oxidativo e pode ser um alvo importante para as ações terapêuticas do lítio. Resultados obtidos a partir de estudos pré-clínicos mostraram que o lítio foi capaz de bloquear os efeitos comportamentais provocados por rotenona, que é um inibidor do complexo I da cadeia de transporte de elétrons (TOKER et al., 2014). Em pacientes com transtorno bipolar, o lítio induziu um aumento na atividade do complexo I mitocondrial (DE SOUZA et al., 2014). Em estudos post-mortem o tratamento do lítio foi associado ao aumento da expressão do gene da subunidade do complexo I em pacientes com transtorno Bipolar (SUN et al., 2006).

Estudos tem também descrito que o lítio regula proteínas associadas a prevenção de formação de radicais livres, peroxidação lipídica e danos ao DNA em humanos e modelos pré-clínicos (MACHADO-VIEIRA, 2018). Em estudos com voluntários saudáveis o lítio

apresentou atividade antioxidante com redução de produção de peróxido de hidrogênio (KHAIROVA et al., 2012). Apesar da etiologia do distúrbio bipolar não estar completamente esclarecido os estudos descritos indicam que o lítio apresenta propriedades antioxidantes e atua na atividade do complexo I mitocondrial, sugerindo uma ação moduladora do estresse oxidativo.

### 1.7.2 O lítio e a inflamação

Outra linha de investigação sugere que a inflamação pode desempenhar um importante papel na fisiopatologia do transtorno bipolar e o lítio pode exercer propriedades anti-inflamatórias (NASSAR; AZAB, 2014). Nesse sentido, estudos tem mostrado que o lítio apresenta efeitos inibitórios em diferentes vias inflamatórias, como supressão da expressão da ciclooxigenase-2, inibição da interleucina (IL)  $-1\beta$ , IL-6, redução da produção de fator de necrose tumoral- $\alpha$  e interferon- $\gamma$  e aumento da síntese de citocinas anti-inflamatórias IL-2 e IL-1 (MALHI; OUTHRED, 2016; NASSAR; AZAB, 2014). No entanto, sob certas condições experimentais, o lítio pode apresentar ação pró-inflamatória induzindo a produção de IL-4, IL-6 e outras citocinas pró-inflamatórias (BARBISAN et al., 2018a; NASSAR; AZAB, 2014).

O mecanismo de ação do lítio, subjacente aos efeitos associados à inflamação, não está totalmente esclarecido, no entanto, estudos tem relacionado a inibição da GSK-3 $\beta$  provocada pelo lítio a alteração de respostas inflamatórias (BARBISAN et al., 2018a; NASSAR; AZAB, 2014).

Hoeflich et al. (2000) mostraram que GSK-3 $\beta$  aumenta a atividade do fator de transcrição NF- $\kappa\beta$  que é um fator nuclear (NF, do inglês nuclear factor) resultando em aumento da inflamação em camundongos. NF- $\kappa\beta$  é chave para a transcrição para uma variedade de genes envolvidos nas respostas imunes e inflamatórias. Estudos subsequentes confirmaram os achados de Hoeflich et al. (2000), mostrando que a inibição da GSK-3 $\beta$  pelo lítio reduziu a produção de mediadores pró-inflamatórios sob várias condições experimentais (NASSAR; AZAB, 2014).

Apesar do acúmulo de evidências indicando que a inibição da GSK-3 $\beta$  atenua a atividade de NF- $\kappa\beta$  (levando a efeitos anti-inflamatórios), resultados opostos também foram publicados (NASSAR; AZAB, 2014). Assim, Rao, Hao e Breyer (2004) mostraram que a inibição de GSK-3 $\beta$  pelo lítio, aumentou a atividade de NF- $\kappa\beta$  e a expressão de COX-2.

Diante de dados divergentes dos estudos com o lítio em relação a inflamação, Barbisan et al. (2018a) usaram modelos *in vitro* para avaliar a influência genética, nutricional e farmacológica na ação da modulação inflamatória do lítio.

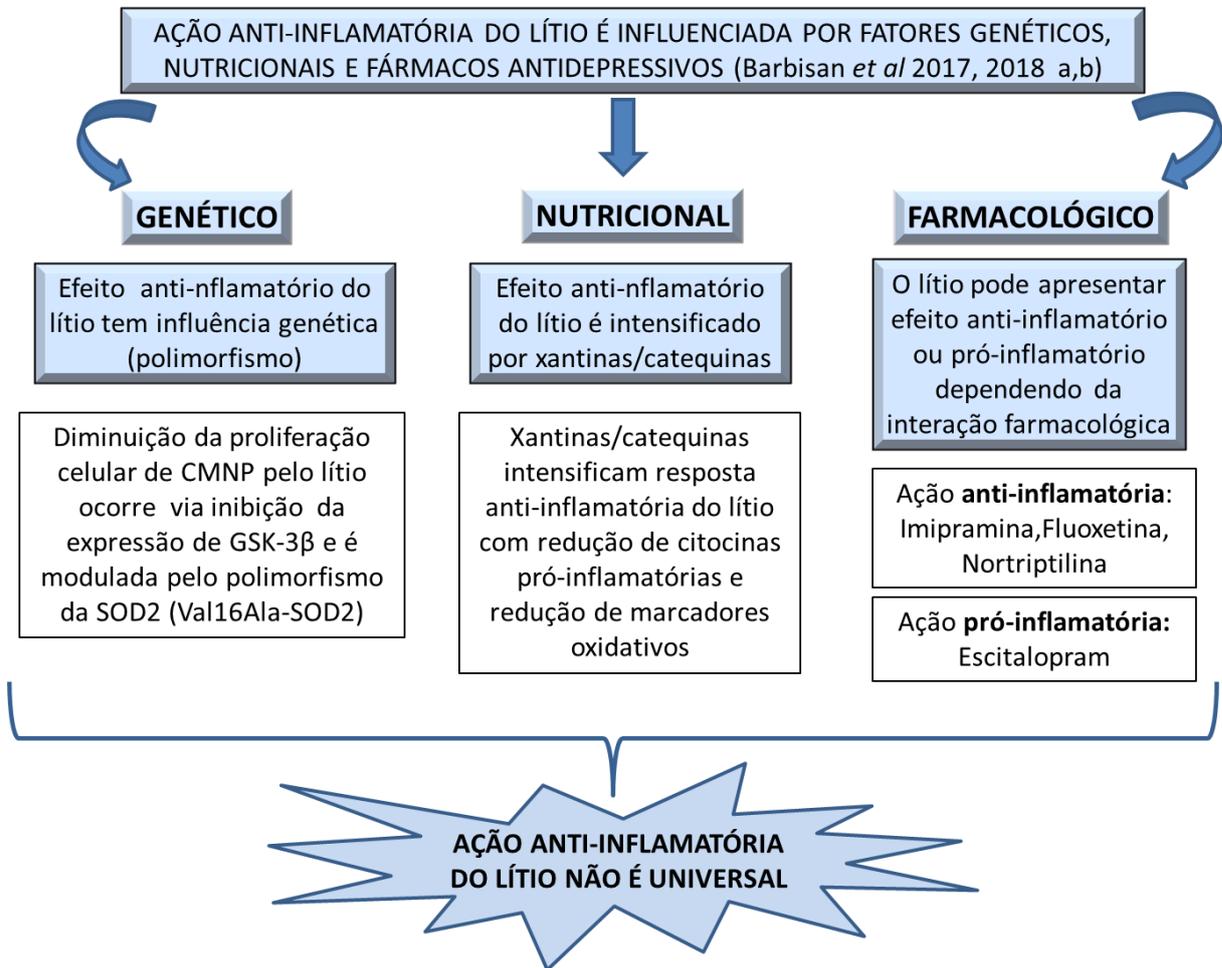
Os estudos genéticos, usando células mononucleares de sangue periférico de voluntários, avaliaram a influência do polimorfismo Val16AlaSOD2, da enzima Superóxido dismutase (SOD<sub>2</sub>), na inibição da expressão gênica da enzima GSK-3 $\beta$  pelo lítio. A SOD2 tem um importante papel no equilíbrio oxidativo e, o polimorfismo Val16AlaSOD2, apresenta alterações estruturais da enzima que acarretam diferentes graus de eficiência de acordo com o genótipo. Os resultados mostraram que o lítio foi capaz de reduzir a proliferação celular de células mononucleares de sangue periférico via inibição da enzima GSK-3 $\beta$ , mas a intensidade dessa resposta foi modulada pelo polimorfismo Val16AlaSOD2 (BARBISAN et al., 2018b).

Os efeitos nutricionais com o lítio, estudados em linhagens celular de macrófagos RAW 264.7, mostraram que uma mistura de xantinas-catequinas foi capaz de intensificar a resposta antiinflamatória do lítio com redução de marcadores inflamatórios e oxidativos (BARBISAN et al., 2017).

Os estudos de interação farmacológica com antidepressivos, em linhagens RAW 264.7, mostraram que o lítio associado com imipramina, nortriptilina ou fluoxetina apresentou uma intensificação da ação antiinflamatória. Por outro lado, a associação entre lítio e escitalopram induziram efeitos pró-inflamatórios (BARBISAN et al., 2018a). Esse conjunto de resultados mostraram que a ação antiinflamatória do lítio não é universal e é influenciada por fatores genéticos, nutricionais e farmacológicos (Figura 12). Cabe ressaltar que os estudo de Barbisan et al. (2018a) avaliaram a interação entre lítio e diferentes antidepressivos e, nenhum estudo foi realizado, para avaliar a influência da interação entre OLZ e Lítio na modulação inflamatória, em modelo *in vitro* de linhagem celular de macrófagos RAW 264.7.

Como foi anteriormente descrito, apesar do lítio ser a primeira escolha para o tratamento do transtorno bipolar, a associação entre lítio e OLZ tem sido usada para tratamentos agudos e de manutenção (GRUNZE et al., 2018; WINGÅRD et al., 2017). Portanto, verificar se tal combinação pode influenciar o estatus inflamatório desencadeado pela OLZ pode ser considerada relevante e pode auxiliar na redução de possíveis efeitos adversos associados ao uso de tal antipsicótico.

Figura 12 - Ação anti-inflamatória do lítio é influenciada por fatores genéticos, nutricionais e fármacos antidepressivos



Fonte: O autor (2019), informações retiradas de Barbisan *et al.* (2017; 2018a; 2018b).

É importante comentar que, uma investigação prévia, conduzida por Aliyazicioğlu *et al.* (2007), realizou análise de sangue de pacientes bipolar tratados com lítio. O estudo mostrou que o lítio sozinho ou em combinação com OLZ apresentava atenuação de marcadores estresse oxidativo. No entanto, esses estudos com lítio a partir da coleta de sangue de pacientes, podem ser influenciados por fatores genéticos, nutricionais e farmacológicos, como mostrado por Barbisan *et al.* (2017, 2018b). Portanto, há a necessidade de investigação específica da modulação oxidativa-inflamatória entre OLZ e lítio, em um modelo controlado *in vitro*, livre de fatores genéticos ou nutricionais, que possa esclarecer a influência da interação farmacológica entre a OLZ e o lítio na modulação da inflamação.

## 1.8 O AÇAÍ COMO MODULADOR DA RESPOSTA OXIDATIVA/INFLAMATÓRIA

Está bem estabelecido que uma dieta balanceada e rica em frutos e vegetais, podem possuir inúmeros efeitos benéficos à saúde humana devido, especialmente, aos efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios e antitumorais destes alimentos (SAGRILLO et al., 2015; SOUZA FILHO et al., 2013). Atualmente muitos têm sido os estudos desenvolvidos utilizando extratos de produtos naturais, como frutos e vegetais, na investigação de suas atividades benéficas, boa parte decorrente da presença de moléculas bioativas como polifenóis, flavonóides, taninos, dentre outros (JOBIM et al., 2014; MACHADO et al., 2015; MOSTARDEIRO et al., 2014; SAGRILLO et al., 2015; SOUZA FILHO et al., 2013). Especialmente no Brasil, tais pesquisas têm grande importância em decorrência da grande biodiversidade vegetal encontrada, principalmente no bioma amazônico e, da necessidade de estudar e caracterizar essa biodiversidade, buscando identificar potencialidades nutricionais, terapêuticas e econômicas (SANTOS et al., 2015; ULBRICHT et al., 2012; YAMAGUCHI et al., 2015).

Dessa forma, o interesse pelo estudo de produtos naturais e alimentos funcionais vem ganhando grande destaque pelos potenciais efeitos benéficos que possam gerar e, especialmente, pela busca do entendimento dos componentes e mecanismos envolvidos nesses efeitos. Um fruto, tipicamente amazônico, que tem mostrado ser um alimento funcional e, com potenciais propriedades terapêutica, é o açaí (ULBRICHT et al., 2012; YAMAGUCHI et al., 2015).

O açaí é o fruto de uma palmeira muito difundida nas áreas de planície e de inundações da região amazônica, pertencente à família *Arecaceae* (Figura 9) (MUÑIZ-MIRET et al., 1996). Estas palmeiras apresentam em média 20-30 metros de altura (JANICK; PAUL, 2008), com múltiplas hastes, as quais suportam em torno de 3 a 8 cachos de frutos, sendo que cada cacho pode apresentar até 900 frutos de açaí (CAMPOS; BOVI; IADEROZA, 1991) (Figura 13A). Os frutos de açaí são de cor roxa a preta e de tamanho pequeno, possuindo em torno de 1-1,5cm de diâmetro. Além da pequena quantidade de polpa, o açaí contém uma semente que corresponde a cerca de 85% do tamanho do fruto (PESSOA; DA SILVA E SILVA, 2007; STRUDWICK; SOBEL, 1988) (Figure 13B).

A comercialização do açaí tem avançado muito, já que este fruto vem sendo usado na produção de diversos produtos de consumo, como bebidas e alimentos a base de açaí, tanto a nível nacional quanto internacional (COISSON et al., 2005; JANICK; PAUL, 2008; SILVA, 2008).

Figura 13 - Ilustrações do *Euterpe oleracea* (Açaí). (A) Palmeira com cachos contendo o fruto; (B) frutos maduros de açaí colhidos



Fonte: Adaptada de Schreckinger et al. (2010).

A população da região amazônica atribue vários efeitos fitoterápicos ao açaí, como por exemplo, efeitos contra problemas gastrointestinais e de disfunções de coagulação, utilizando não somente o fruto, mas também a casca do tronco e folhas da palmeira (MATHEUS et al., 2006).

No açaí, aproximadamente 90 substâncias foram descritas, das quais cerca de 31% consiste em flavonóides, seguido de compostos fenólicos (23%), lignóides (11%) e as antocianinas (9%). Outras classes incluem ácidos graxos, quinonas, terpenos e norisoprenoides (YAMAGUCHI et al., 2015).

Tem crescido os estudos demonstrando os efeitos biológicos positivos do açaí, incluindo pesquisas envolvendo neuroproteção, estresse oxidativo, inflamação e síndrome metabólica (ULBRICHT et al., 2012; YAMAGUCHI et al., 2015).

### 1.8.1 Ações neuroprotetoras do açaí

Wong et al. (2013), utilizando modelo experimental para doença de Alzheimer, descreveram um efeito neuroprotetor do extrato de açaí em células PC12. Neste estudo, o extrato de açaí protegeu as células contra a exposição a  $\beta$ -amilóide1-42, aumentando a viabilidade celular para níveis similares as células controle, bem como inibindo a formação de fibrilas e agregados amilóides.

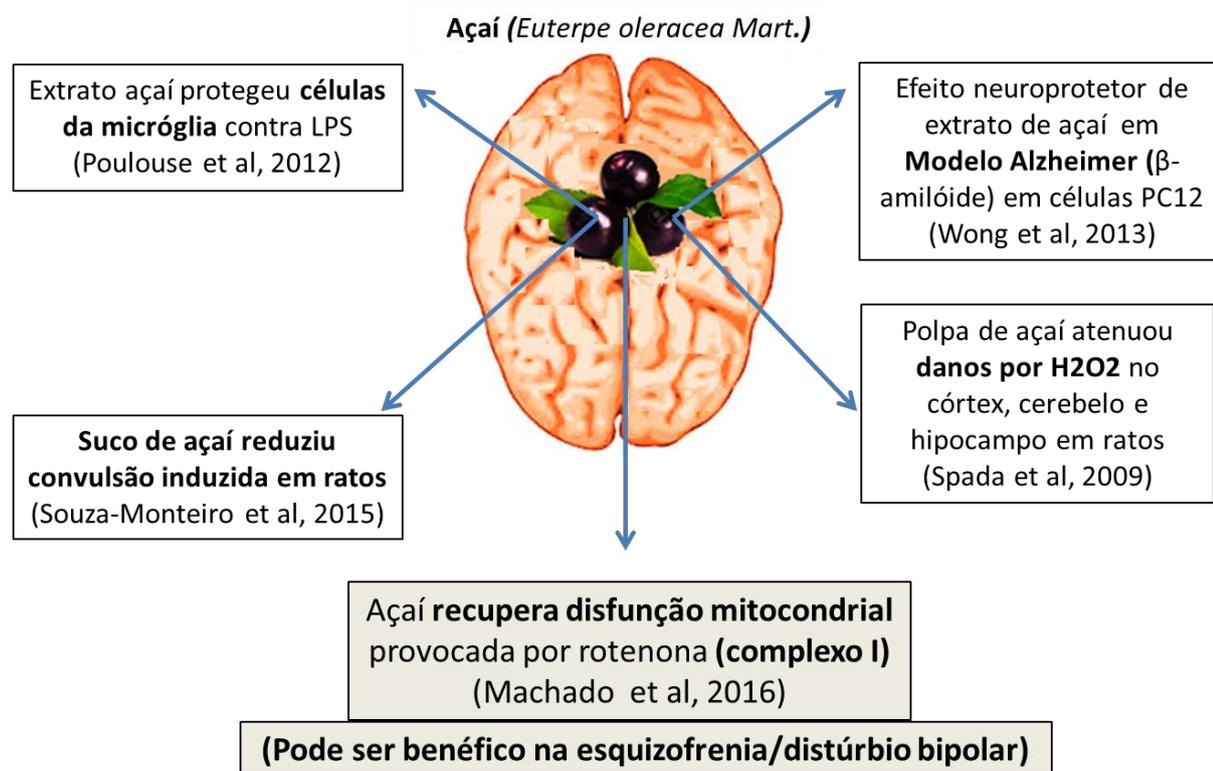
Outrossim, na pesquisa de Poulouse et al. (2012), o extrato de açaí mostrou-se capaz de proteger células BV-2, linhagem celular do tipo micróglia, contra a exposição prévia ao

lipopolissacarídeo (LPS), reduzindo a produção de nitrito, bem como os níveis de ciclooxigenase-2 (COX-2), do fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e fator nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B).

De acordo com Souza-Monteiro et al. (2015), o suco do açaí foi eficaz na diminuição de convulsão induzida por pentilenotetrazol em ratos, além de prevenir significativamente a lipoperoxidação na região do córtex cerebral. Além disso, a suplementação de polpa de frutas de açaí congeladas atenuou danos provocados por peróxido de hidrogênio no córtex cerebral, cerebelo e hipocampo de ratos (SPADA et al., 2009).

Machado et al. (2016) mostraram o efeito protetor do açaí em linhagem de células neuronais SH-SY5Y expostas a rotenona, conhecida por provocar disfunção da cadeia de transporte de elétrons do complexo I mitocondrial. O açaí foi capaz de recuperar a atividade enzimática do complexo mitocondrial I, diminuir a produção de EROs e peroxidação lipídica, aumentar a viabilidade e proliferação celular. A Figura 14 mostra as principais ações neuroprotetoras do açaí.

Figura 14 - Principais ações neuroprotetoras do açaí



Fonte: O autor (2019), informações retiradas de Machado et al. (2016), Poulouse et al. (2012), Souza-Monteiro et al. (2015), Spada et al. (2009) e Wong et al. (2013).

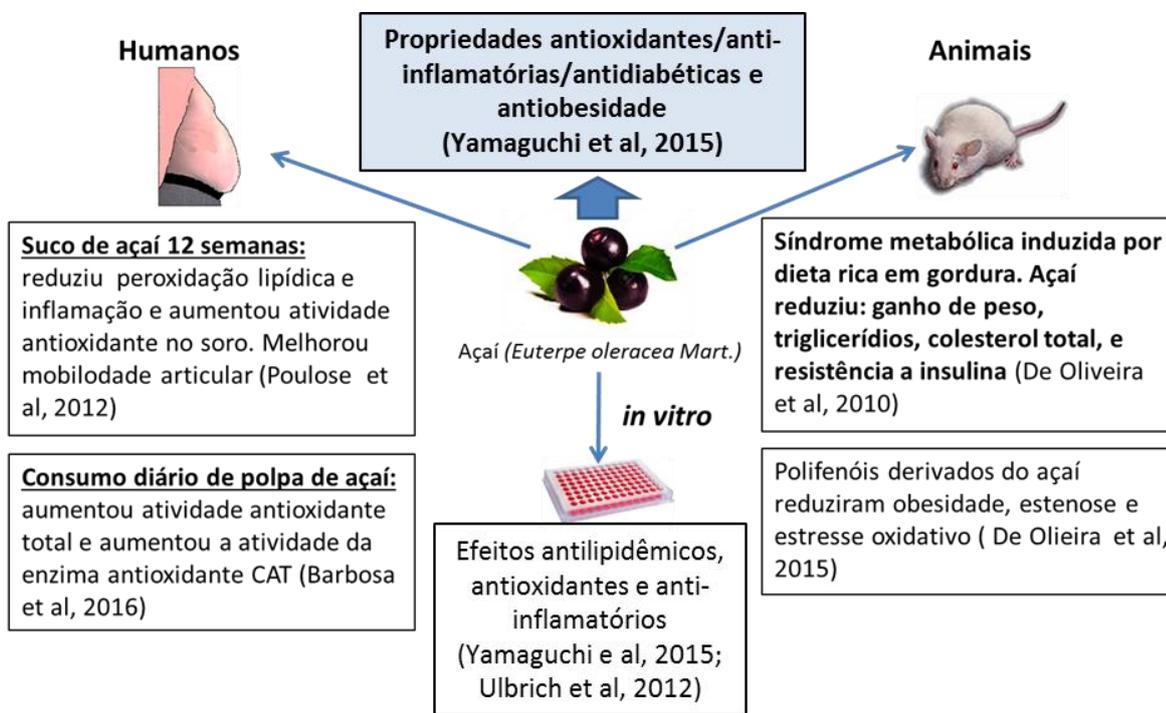
### **1.8.2 Ações do açaí relacionadas a obesidade, síndrome metabólica, estresse oxidativo e inflamação**

Uma ampla revisão da literatura tem indicado o crescimento de estudos que apontam que o açaí apresenta propriedades antioxidante, antiinflamatória, antidiabéticas e antiobesidade (ULBRICHT et al., 2012; YAMAGUCHI et al., 2015). De fato, um estudo em humanos, conduzido por Poulou et al. (2012), descreveu que a suplementação da dieta com suco de açaí por 12 semanas reduziu a peroxidação lipídica, provocou o aumento da atividade antioxidante no soro, diminuiu inflamação e melhorou a mobilidade articular e alterou a percepção da dor. Nessa mesma linha, Barbosa et al. (2016) estudaram o consumo diário de polpa de açaí e observaram um significativo aumento da capacidade antioxidante total, principalmente da enzima antioxidante CAT e redução dos níveis de carbonilação proteica, sugerindo o potencial efeito antioxidante deste fruto.

Estudos com ratos com síndrome metabólica induzida por uma dieta rica em gordura mostrou que extrato do açaí conseguiu reduzir o ganho de peso, triglicerídios, colesterol total e resistência a insulina, indicando o seu potencial para uso na síndrome metabólica (DE OLIVEIRA et al., 2010). Além disso, outro estudo mostrou que polifenóis derivados do açaí reduzem em ratos, a obesidade, a estenose e o estresse oxidativo (DE OLIVEIRA et al., 2015). Nesse mesmo sentido, estudos *in vitro* tem mostrado efeitos antilipidêmicos, antioxidante e anti-nflamatórios do açaí (ULBRICHT et al., 2012; YAMAGUCHI et al., 2015). A Figura 15 mostra as principais ações do açaí relacionada a temática obesidade, síndrome metabólica, estresse oxidativo e inflamação.

As principais propriedades descritas do açaí o tornam um candidato em potencial para estudos relacionados a pacientes esquizofrênicos e seus tratamentos, por duas particularidades. Primeiro, como já descrito, os ASG apresentam um estado oxidativo/ inflamatório de baixo grau crônico que pode estar relacionado ao efeito adverso dessas medicações provocar maior risco de obesidade e síndrome metabólica. O açaí tem apresentado em diferentes estudos ação antioxidante, antiinflamatória e antiobesidade. Segunda particularidade é que, como já descrito, alguns estudos indicam que pacientes esquizofrênicos, como também pacientes com transtorno bipolar, podem ter um nível de estresse oxidativo elevado e isso pode ocasionar alterações no SNC gerando disfunção. Portanto, o açaí tem potencial para ser usado por pacientes com esquizofrênia e transtorno bipolar, tanto pela possibilidade de diminuir efeitos adversos quanto pela neuroproteção. No entanto, estudos *in vitro* são necessários para compreender como o açaí poderia modular a resposta inflamatória da OLZ.

Figura 15 - Ações do açaí relacionada a obesidade, síndrome metabólica, estresse oxidativo e inflamação



Fonte: O autor (2019), informações retiradas de Barbosa et al. (2016), De Oliveira et al. (2010; 2015), Poulose et al. (2012), Ulbricht et al. (2012) e Yamaguchi et al. (2015).

## 1.9 HIPÓTESE DO ESTUDO

Evidências descritas na literatura sugerem que pacientes que fazem uso de OLZ apresentam aumento no risco de ganho de peso, síndrome metabólica, diabetes mellitus tipo 2 e morbidades cardiovasculares que aumentam o risco de morte e reduzem o tempo de vida. Evidências tem sugerido que o estresse oxidativo e a inflamação crônica poderiam estar contribuindo para a ocorrência desses efeitos adversos. Apesar disso, não está esclarecido se a resposta oxidativa-inflamatória de células imunes, provocada por OLZ, poderia ser influenciada por interações farmacológicas e nutricionais. Nesse contexto, considerando a associação entre OLZ e o lítio na clínica psiquiátrica e, ainda, considerando o açaí uma fruta nativa brasileira rica em compostos bioativos, o presente estudo está subsidiado nas seguintes hipóteses:

- a) a ação oxidativa-inflamatória da OLZ poderia ser influenciada pela interação farmacológica com o lítio;
- b) a ação oxidativa- inflamatória da OLZ poderia ser atenuada pelo açaí.

## 1.10 OBJETIVOS

### 1.10.1 Objetivo geral

Avaliar *in vitro* a influência de fatores farmacológicos e nutricionais na resposta oxidativa e inflamatória induzida pela OLZ.

### 1.10.2 Objetivos específicos

- a) avaliar *in vitro* o efeito da OLZ sobre marcadores oxidativos e inflamatórios em células de macrófagos RAW 264.7;
- b) avaliar *in vitro* o efeito do Lítio sobre marcadores oxidativos e inflamatórios em células de macrófagos RAW 264.7;
- c) avaliar *in vitro* o efeito do açaí sobre marcadores oxidativos, inflamatórios e apoptóticos em células de macrófagos RAW 264.7;
- d) investigar *in vitro* a influência da exposição simultânea do lítio e OLZ na modulação de marcadores oxidativos e inflamatórios de macrófagos RAW 264.7;
- e) investigar *in vitro* a influência da exposição simultânea do extrato hidroalcoólico do açaí e OLZ na modulação de marcadores oxidativo, inflamatórios e apoptóticos em células de macrófagos RAW 264.7.



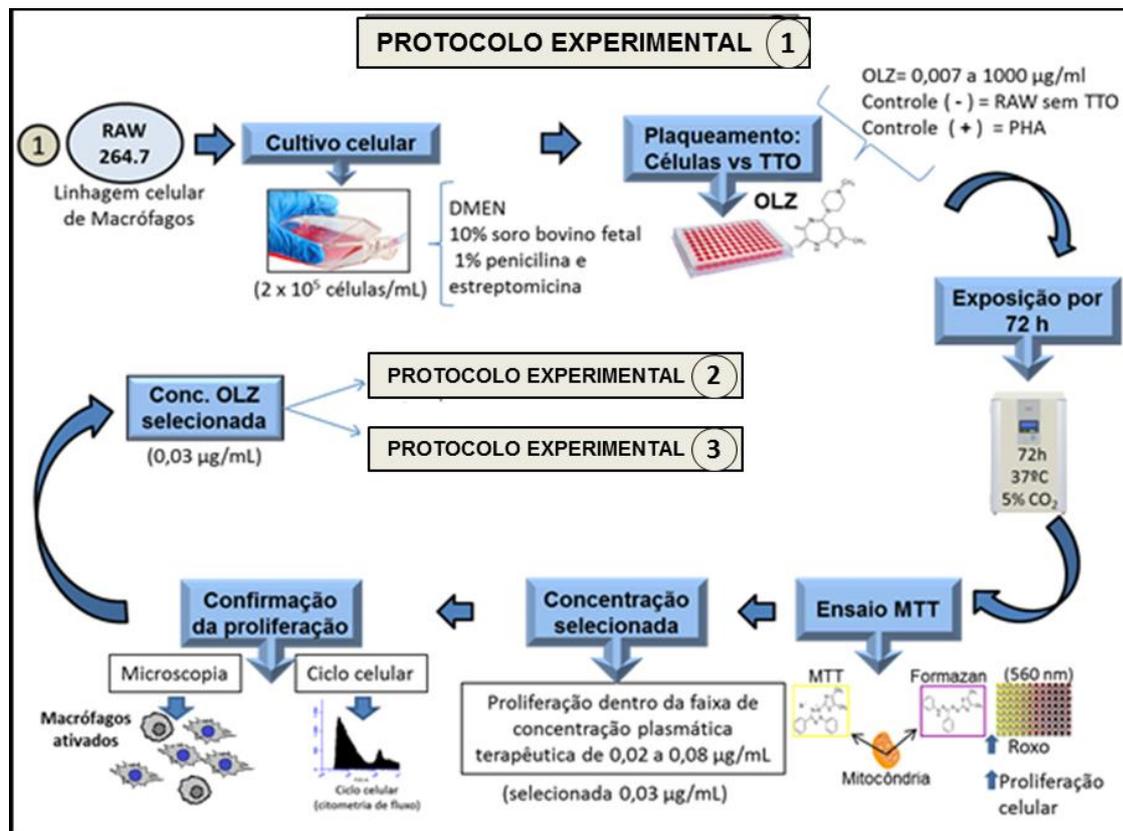
## 2 DELINEAMENTO METODOLÓGICO GERAL

O delineamento geral do estudo foi do tipo *in vitro* utilizando como modelo experimental macrófagos comerciais da linhagem RAW 264.7 produzidos pela *American Type Culture Collection* (ATCC-Manassas-USA). Neste estudo foram conduzidos três protocolos experimentais *in vitro* para responder aos objetivos específicos desta tese, que geraram como resultado a confecção de dois artigos. Todos os experimentos *in vitro* foram realizados com células cultivadas em meio RPMI suplementado com 10% de soro bovino fetal, 1% de antibiótico e 1% de antifúngicos, em condições estéreis mantidas em incubadora de CO<sub>2</sub> com saturação de 5%, a 37°C. Os itens “material e métodos” estão descritos e referenciados em cada artigo descrito mais adiante, nos resultados. Para melhor clareza, será descrito o delineamento geral dos 3 desenhos experimentais. Todos os testes foram realizados em triplicata e os detalhes dos protocolos utilizados são descritos em maior detalhe nos manuscritos do presente estudo.

### 2.1 PROTOCOLO EXPERIMENTAL 1

O objetivo deste protocolo foi selecionar uma concentração de OLZ com capacidade para desencadear resposta inflamatória satisfatória e ser utilizada nos estudos posteriores. Para tanto os macrófagos foram expostos a uma ampla faixa de concentrações de OLZ que variou de 0,007 a 1000µg/mL. A fitohemaglutinina (PHA, do inglês, Phytohemagglutinin) foi utilizada como controle positivo (inflamatório). Após 72h de incubação, a presença de indicadores de inflamação foi avaliada via análise da taxa de proliferação celular e modificações morfológicas que indicaram a transformação de monócitos em macrófagos e que incluem também o espraiamento (*spreaeding process*) destas células na placa de cultura (Figura 16). Com base nos resultados obtidos, foi selecionada uma concentração de OLZ que estivesse dentro da faixa de concentração plasmática terapêutica (0,02 a 0,08µg/mL). Testes adicionais de modulação do ciclo celular e de marcadores oxidativos foram conduzidos na concentração pró-inflamatória da OLZ utilizada nos protocolos adicionais.

Figura 16 - Protocolo experimental 1



Fonte: O autor (2019).

## 2.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL 2

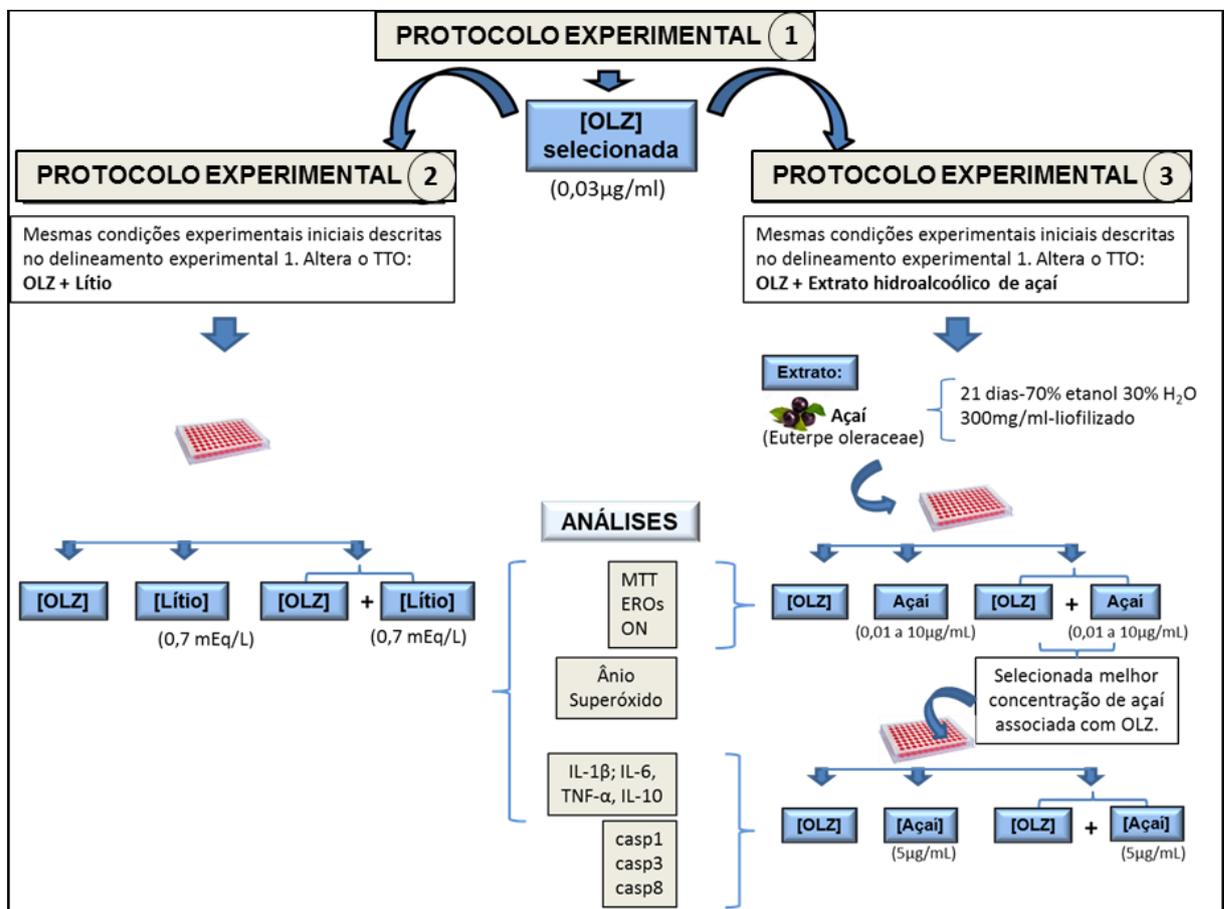
O objetivo deste protocolo foi avaliar a influência do lítio na resposta oxidativa-inflamatória desencadeada pela OLZ. No caso, macrófagos foram expostos a concentração selecionada de OLZ (0,03µg/mL) via protocolo experimental 1, com exposição concomitante ao a lítio 0.7mEq/L. Essa concentração de lítio foi escolhida por estar dentro da faixa plasmática terapêutica preconizada e ter sido anteriormente utilizada em estudos in vitro prévios conduzidos por Barbisan et al. (2018a) e Duarte et al. (2018). Foram avaliados, após 72h de exposição, a proliferação celular, marcadores oxidativos (óxido nítrico, superóxido, produção de EROS) e análise dos níveis de citocinas inflamatórias (IL-1β, IL-6, TNF-α) e antiinflamatória (IL-10), e também, expressão gênica (este último, após 24h).

## 2.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL 3

O objetivo deste protocolo foi avaliar a influência do extrato hidroalcoólico do açaí na resposta oxidativa-inflamatória da OLZ. O açaí foi adquirido na cidade de Manaus-AM, após a

extração (21 dias em solução contendo 70% etanol e 30% água destilada, concentração de 300mg/mL) foi liofilizado. Macrófagos foram expostos a concentração selecionada de OLZ (0,03µg/mL), a concentrações de açaí (0,01; 0,05; 0,1; 1; 5; 10 µg/mL) e concomitantemente, OLZ e as concentrações de açaí. Foram avaliados a proliferação celular e marcadores oxidativos (EROs e ON). Baseado nos resultados, foi selecionada uma das associações (concentração) entre a OLZ e açaí para avaliar citocinas inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ), antiinflamatória (IL-10) e caspases (caspase 1, 3 e 8). A Figura 17 resume esquematicamente os protocolos experimentais 2 e 3.

Figura 17 - Protocolo experimental 2 e 3



Fonte: O autor (2019).



### 3 RESULTADOS

Os resultados desta tese estão descritos e organizados sob a forma de dois manuscritos.

O primeiro estudo foi publicado na revista *Revista Plos On* (fator de impacto 3.05) com o título de: *Lithium is able to minimize olanzapine oxidative-inflammatory induction on macrophage cells.*

O segundo manuscrito foi submetido a *Revista In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal* (fator de impacto 1.44) denominando *Açaí (Euterpe oleracea Mart.) modulates in vitro pro-inflammatory response induced by olanzapine, an antipsychotic drug.* No momento, esse estudo se encontra em fase de revisão menor nesta revista científica.

Na presente tese, ambos os manuscritos estão formatados conforme as normas das respectivas revistas.



#### 4 ARTIGO 1 - LITHIUM IS ABLE TO MINIMIZE OLANZAPINE OXIDATIVE-INFLAMMATORY INDUCTION ON MACROPHAGE CELLS

**Full title:** Lithium is able to minimize olanzapine oxidative-inflammatory induction on macrophage cells

**Short title:** Lithium minimizes Olanzapine oxi-inflammatory induction

Marcelo Soares Fernandes<sup>1,2¶</sup>, Fernanda Barbisan<sup>3¶</sup>, Verônica Farina Azzolin<sup>3</sup>, Pedro Antônio Schmidt do Prado-Lima<sup>4</sup>, Cibele Ferreira Teixeira<sup>1</sup>, Ivo Emílio da Cruz Jung<sup>1</sup>, Charles Elias Assmann<sup>5</sup>, Rogerio Tomasi Riffel<sup>2,6</sup>, Marta Maria Medeiros Frescura Duarte<sup>1,7</sup>, Ednea Maia Aguiar- Ribeiro<sup>8</sup>, Ivana Beatrice Mânica da Cruz<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup> Pharmacology Graduate Program, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

<sup>2</sup> Federal University of the Southern Frontier, Passo Fundo, RS, Brazil

<sup>3</sup> Gerontology Graduate Program, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

<sup>4</sup> Brain Institute, Catholic University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, Brazil

<sup>5</sup> Biochemical Toxicology Graduate Program, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

<sup>6</sup> Hospital of Clinics of Passo Fundo, Passo Fundo, RS, Brazil

<sup>7</sup> Lutheran University of Brazil, Santa Maria- RS, Brazil

<sup>8</sup> Open University of the Third Age, State University of Amazonas, Manaus-AM, Brazil

¶ These authors contributed equally to this work.

\* Corresponding author at: E-mail: ivana.ufsm@gmail.com

## Abstract

**Background:** Olanzapine (OLZ) is a second-generation antipsychotic drug used for treatment of schizophrenia, bipolar disorder, and other neuropsychiatric conditions. Undesirable side effects of OLZ include metabolic alterations associated with chronic oxidative-inflammation events. It is possible that lithium (Li), a mood modulator that exhibits anti-inflammatory properties may attenuate OLZ-induced oxi-inflammatory effects.

**Methodology:** To test this hypothesis we activated RAW 264.7 immortalized macrophages with OLZ and evaluated oxidation and inflammation at the gene and protein levels. Li and OLZ concentrations were determined using estimated plasma therapeutic concentrations.

**Results:** OLZ triggered a significant increase in macrophage proliferation at 72 h. Higher levels of oxidative markers and pro-inflammatory cytokines, such as TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6, with a concomitant reduction in IL-10, were observed in OLZ-exposed macrophages. Lithium (Li) exposure triggered a short and attenuated inflammatory response demonstrated by elevation of superoxide anion (SA), reactive oxygen species (ROS), IL-1 $\beta$ , and cellular proliferation followed by elevation of anti-inflammatory IL-10 levels. Li treatment of OLZ-supplemented macrophages was able to reverse elevation of oxidative and inflammatory markers and increase IL-10 levels.

**Conclusions:** Despite methodological limitations related to *in vitro* protocols, results suggested that Li may attenuate OLZ-induced oxidative and inflammatory responses that result from metabolic side effects associated with OLZ.

**Keywords:** Schizophrenia; Bipolar Disorder; Inflammation; Oxidative stress; Drug Interaction.

## Introduction

Olanzapine (OLZ) is an atypical antipsychotic drug of the thienobenzodiazepine class. OLZ blocks multiple neurotransmitter receptors, including D2 and 5-HT<sub>2A</sub> receptors. OLZ is used to treat resistant and non-resistant schizophrenia in children and adolescents [1,2], therapeutic maintenance of bipolar disorder [2,3], management of agitation in adults with progressive dementia [4], and treatment of Huntington's Disease [5,6]. Moreover, OLZ is used to attenuate chemotherapy-induced nausea and vomiting, including in children under 13 years of age [7,8].

OLZ has pleiotropic effects by acting on diverse neurotransmission pathways. However, the non-specific nature of this antipsychotic drug results in numerous metabolic side effects including weight gain, dry mouth, somnolence, constipation, and increased appetite. Clinical studies, such as Ferno et al [9], showed dose-dependent lipogenic effects due 5-HT<sub>2C</sub> and H<sub>1</sub> receptor antagonism after the first 6 weeks of treatment. Furthermore, OLZ causes glycemic disruptions associated with increased risk of developing type 2 diabetes mellitus. Continuous use of OLZ has been associated with higher cardiovascular risk [10].

Studies have suggested that chronic inflammatory processes, via macrophages and inflammatory cytokines, may be responsible for increased risk of obesity [11]. In fact, oxidative-inflammatory mechanisms have been hypothesized to play a role in onset of metabolic side effects associated with OLZ administration [12,13]. This OLZ action involves macrophages activation, that is a cell presenting in blood and in tissues such as fat-tissue [14-15]. Exposure of human adipose-derived stem cells to several antipsychotics, including OLZ, resulted in up-regulation on gene expression and levels of pro-inflammatory cytokines such as IL-1 $\beta$ , NF- $\kappa$  $\beta$ , and IL-8, suggesting a direct effect on the immune system [13].

Furthermore, administration of OLZ for five weeks resulted in weight gain, increased visceral fat, infiltration of macrophages, and higher TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6 levels in rat fat-tissue [15,16]. OLZ was also able to upregulate macrophage migration inhibitory factor in adipose tissue reducing lipolysis and increasing lipogenic pathways [17].

As polypharmacy is a common clinical practice, investigation of whether psychiatric drugs with anti-inflammatory properties may attenuate metabolic side effects of pro-inflammatory drugs when administered simultaneously [18]. This is the Lithium (Li) case, that is an efficient mood modulator molecule concomitantly used in management of acute mania or manic episodes associated with bipolar disorder [19] and to treat some mixed episodes of major depressive and bipolar disorders [20]. Moreover, the combination of Li plus OLZ has been indicated to treat some mixed episodes of major depressive and bipolar disorders [2,20]. Previous *in vitro* study also suggested that Li could modulate *in vitro* pro-inflammatory macrophage response exposed to some antidepressant drugs [21]. To test this hypothesis, an *in vitro* study was performed here using RAW 264.7 macrophages exposed at different OLZ and Li at a plasmatic therapeutic range concentration.

## Material and Methods

### Chemicals and equipment

All chemicals and reagents used in this study were analytical grade and purchased from Merck (Darmstadt, Germany) or Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA). All experiments were performed using pure Li, obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Plastics and reagents used for cell culture procedures were acquired from Gibco (Thermo Fisher Scientific; Grand Island, NY, USA). Molecular biology

reagents were as follows: TRIzol reagent (Thermo Fisher Scientific; Grand Island, NY, USA), iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad Laboratories; Hercules, CA, USA), DNase (Invitrogen Life Technologies; Carlsbad, CA, USA), QuantiFast SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Immunoassay Kits were purchased from Abcam (Cambridge, MA- USA), Protocols involving spectrophotometric and fluorimetric analysis were executed using a 96-well microplate reader (SpectraMax M2/M2e Multimode Plate Reader; Molecular Devices- Sunnyvale, CA, USA).

### **General experimental design**

*In vitro* experiments were performed using a commercially available RAW 264.7 immortalized macrophage cell line (ATCC TIB-71) obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) cultured under standardized conditions. Cells were cultured using Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) with 10% fetal bovine serum (FBS), supplemented with 1% penicillin/streptomycin and 1% amphotericin B antifungal. Cell cultures were maintained at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> and expanded to obtain cell number to perform the experiments.

All protocols performed were similar to previously described studies by Barbisan et al. [22] and Duarte et al. [23] of *in vitro* psychotropic drug effects on macrophage inflammatory response. Macrophages are highly sensitive to antigens and other antigenic factors, which induce intense cellular proliferation and morphological changes. These alterations, especially cellular proliferation in 72 h cell cultures, can be used as markers of inflammatory activation of immune cells. A concentration-effect curve (0.007 to 1000 µg/mL) was generated using OLZ concentrations bracketing plasma therapeutic (0.02 and 0.08 µg/mL) OLZ values. OLZ plasma therapeutic values

are published in guidelines for therapeutic drug monitoring in neuropsychopharmacology [24]. Phytohemagglutinin (PHA) antigen (125 µg/mL) treatment was used as a positive inflammatory control [21].

The OLZ concentration that triggered the highest inflammatory response was chosen and confirmed by evaluation of cytomorphological alteration, cell cycle modulation, and protein and gene expression analysis of pro- and anti-inflammatory cytokines. Following determination of OLZ concentration, macrophages were concomitantly exposed to OLZ plus Li at 0.7 mEq/L. This concentration was chosen based on Barbisan et al [21].

### **Cell proliferation analysis**

MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) tetrazolium reduction assay was used as a method to evaluate cell proliferation in 72 h cell cultures. This procedure was modified, but we used Mosmann [25] for guidance. Briefly, cells were seeded in 96-well plates at a final concentration of  $2 \times 10^5$  cells/mL and MTT reagent was added to the cells at a final concentration of 0.5 mg/mL. After 1 h of incubation at 37°C, formazan crystals were solubilized using dimethyl sulfoxide (DMSO) and absorbance was recorded at 560 nm using a plate reading spectrophotometer (SpectraMax i3x Multi-Mode Microplate Reader; Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

### **Cell cycle analysis**

Cell cycle analysis was performed by flow cytometry. In short, cells were seeded in 6-well plates ( $1 \times 10^4$  cells). Following 72 h treatment, cells underwent resuspension in 70% ethanol and were stored overnight at -20°C. After storage, cells

were resuspended in 500  $\mu\text{L}$  of staining solution prepared in PBS, which consisted of 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  PI, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  RNase, and 0.05% Triton X-100, and incubated at 37°C for 40 min. Cell cycle analysis was performed using a BD Accuri C6 instrument [26].

### **Oxidative markers analysis**

Modulation of oxidative stress was evaluated in 72 h cell cultures exposed to OLZ and Li by analysis of superoxide, ROS, and nitric oxide levels. Superoxide levels were quantified using a colorimetric assay that produces a formazan salt via reaction with nitroblue tetrazolium (NBT) chloride, following a protocol previously published by Morabito et al. [27]. Briefly, the cells were seeded in a 96-well plate, diluted in 1 $\times$  PBS, treated with 10  $\mu\text{L}$  of NBT solution (10 mg/mL), homogenized, incubated at 37°C for 3 h, and centrifuged. 75  $\mu\text{L}$  of supernatant was removed, and an equal volume of DMSO was added to each well. After incubation for 20 min at 37°C, 75  $\mu\text{L}$  of the cell suspension was transferred to another 96-well plate, and the absorbance measured at 540 nm.

Total levels of reactive oxygen species (ROS) were quantified in RAW 264.7 cells using the 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) assay. DCFH-DA is a nonfluorescent chemical that is deacetylated by mitochondrial esterase enzymes to DCFH which reacts with ROS and becomes DCF, a fluorescent molecule. Fluorescence was recorded at an excitation wavelength of 488 nm and an emission wavelength of 525 nm [28]. NO levels were measured after 72 h by the Griess modified method [29]. In short, RAW 264.7 cells were incubated at room temperature with the Griess reagent for 10 min and the absorbance was recorded at 550 nm wavelength.

## **Cytokine immunoassays**

All analyses were performed in 72 h cell culture samples. Analysis of cytokine levels (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , and IL-10) provides information on activation of inflammatory pathways. Caspase levels (CASP-8, CASP-3 and CASP-1) may indicate activation of the apoptosis pathway. Cytokines levels in cell culture supernatants were measured, according to the manufacturer's instructions (Abcam, Cambridge, MA- USA).

Briefly, all reagents and working standards were prepared per manufacturer's instructions prior to adding 50  $\mu$ L of the assay diluent RD1W to each well. 100  $\mu$ L of standard control for each sample was added per well, after which the well was covered with an adhesive strip and incubated for 1.5 h at room temperature. Each well was subsequently aspirated and washed twice, for a total of three washes. The antiserum of each molecule analyzed into wells and the plate was covered with a new adhesive strip, and subsequently incubated for 30 min at room temperature. The aspiration/wash step was repeated, and the conjugate (100  $\mu$ L) was added to each well and incubated for 30 min at room temperature. Each well was again aspirated and washed before adding 100  $\mu$ L of substrate solution to each well, followed by incubation at room temperature for an additional 20 min. Following incubation, 50  $\mu$ L of stop solution was added to each well. Optical density was determined within 30 min at 450 nm using a microplate reader.

## **Gene expression analysis**

Gene expression of cytokines in RAW 264.7 macrophages (pro inflammatory *IL-1 $\beta$* , *IL-6*, *TNF- $\alpha$*  and anti-inflammatory *IL-10*) was analyzed by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) after 24 h of incubation [21]. Briefly, total RNA was isolated with TRIzol and quantified spectrophotometrically at 260 nm wavelength.

Reverse transcription was performed using the iScript cDNA synthesis kit. RNA was added to a final concentration of 1 µg/µL with 0.2 µL of DNase. Generation of cDNA was performed using 1 µL of iScript reverse transcriptase and 4 µL of iScript Mix. Quantitative RT-PCR was performed in a total reaction volume of 20 µL with 1 µL of cDNA and 1x QuantiFast SYBR Green PCR Kit in a Rotor-Gene Q instrument (Qiagen, Hilden, Germany). The specific primer pairs of cytokines used in this study were: IL-1β Forward GCGGCATCCAGCTACGAAT and Reverse ACC AGCATCTTCCTCAGCTTGT; IL-6 Forward TACCCCCAGGAGAAGATTCCA and Reverse CCGTCGAGGATGTACCGAATT; TNF-α Forward CAA CGGCATGGATCTCAAAGAC and Reverse TATGGGCTCATACCAGGGTTTG; IL-10 Forward GTGATGCCCAAGCTGAGA and Reverse TGCTCTTG TTTTCACAGGGAAGA. Beta-actin, a housekeeping gene was used as an internal control. Relative expression was calculated using comparative CT (Cytosine-Timine) and was expressed as the fold expression compared to the control.

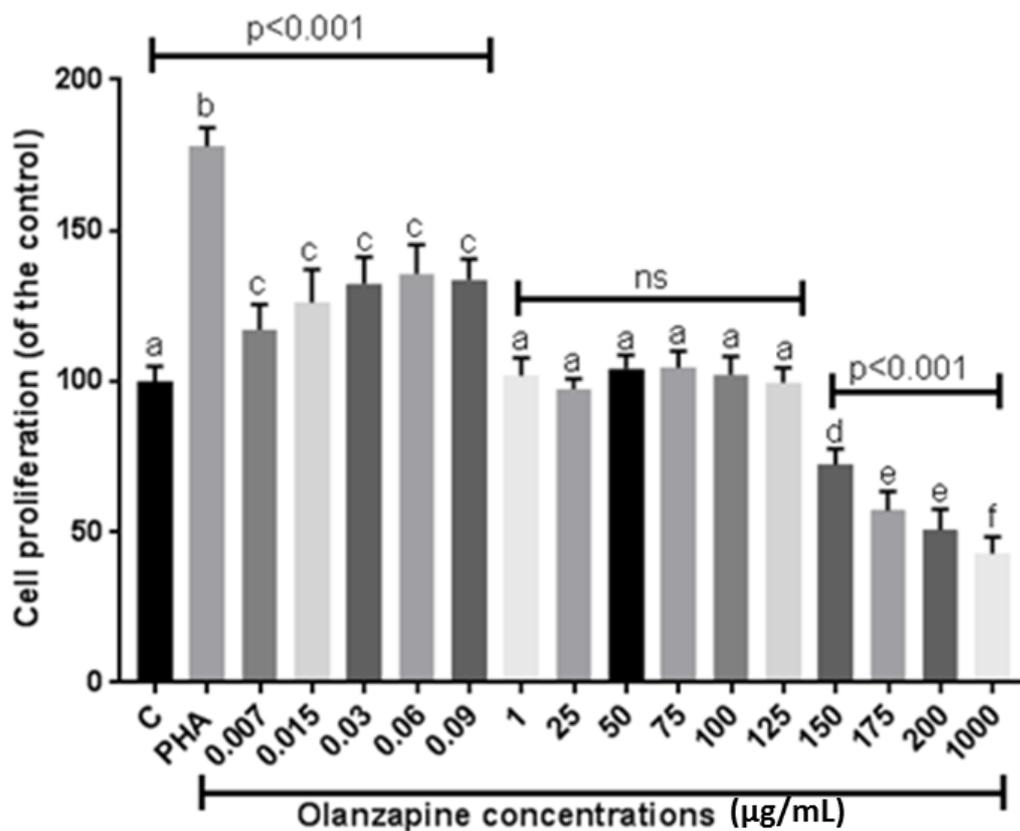
### **Statistical analyses**

The results obtained from all in vitro protocols were analyzed using GraphPad *Prism 6* statistical package software. All experiments were performed in independent triplicates. This data treatment protocol is broadly used in the in vitro analysis in order to allow comparison among results obtained from different days or by different laboratories [30]. Outliers were eliminated considering upper and lower values of 2-SD range since indicated some experimental imprecision. All variables were tested for distribution normality using the Shapiro-Wilk method. Data were compared with one-way or two-way analysis of variance followed by Tukey's post hoc tests. Data are

presented as mean  $\pm$  SD relative to negative control group. The alpha value was  $p \leq 0.05$  to indicate the threshold for statistical significance.

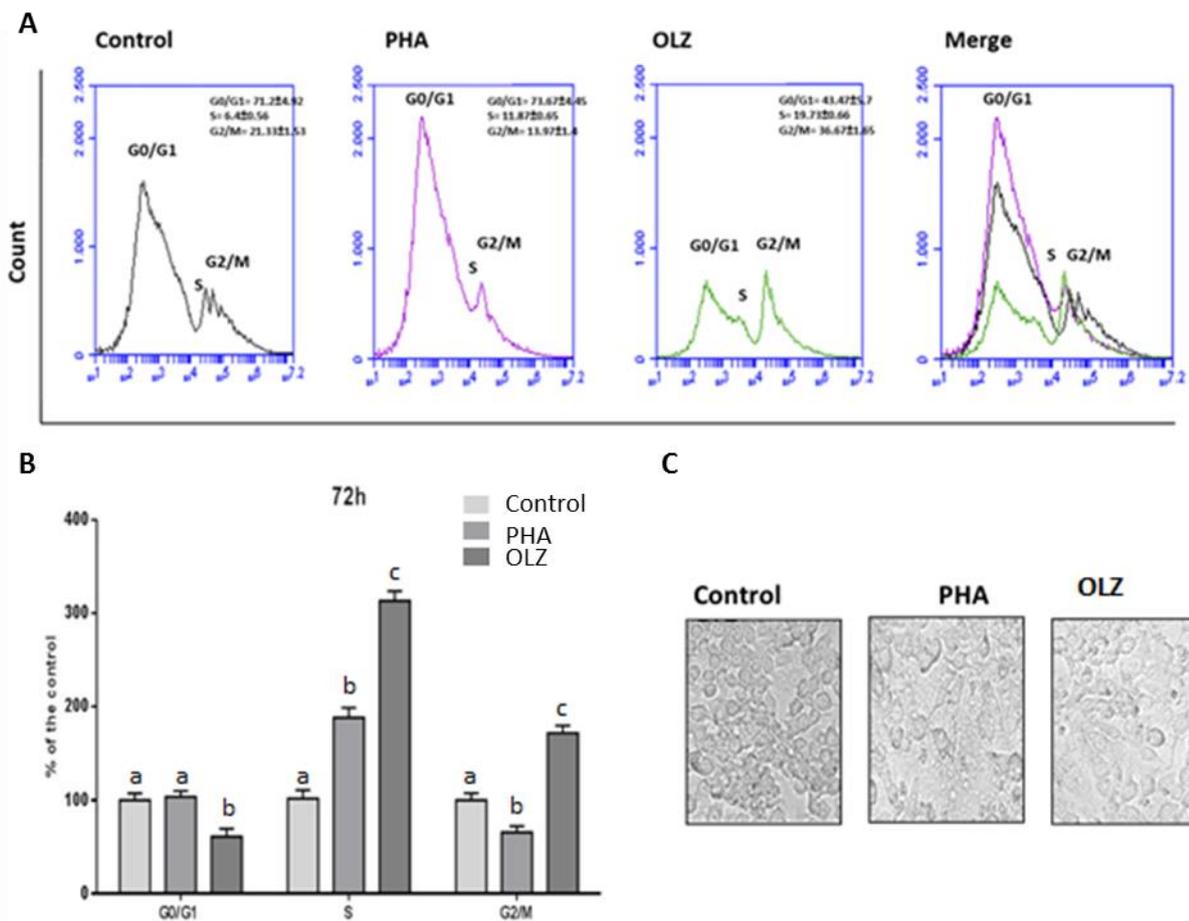
## Results

Macrophage proliferation in response to OLZ was evaluated as an indicator of oxi-inflammatory activation (Fig 1). Results showed a hormetic response to OLZ in macrophages, with lower OLZ concentrations (0.007-0.09  $\mu\text{g/mL}$ ) resulting in increased cellular proliferation, while higher concentrations significantly decreased growth of cultures, indicating a cytotoxic or immunosuppressive OLZ effect (150-1000  $\mu\text{g/mL}$ ). The pro-inflammatory effect of OLZ at lower concentrations was confirmed by comparison to a similar response triggered by macrophage exposure to PHA antigen.



**Fig 1.** Effect on RAW macrophages cellular proliferation in 72 h cultures e cellular of OLZ (OLZ) at different concentrations. C = non-treated cells; PHA = cells activated by phytohemagglutinin antigen exposure. Treatments were compared using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Tukey *post hoc* test. Different letters (i.e., A, B, C, D, E, F) indicated significant statistical differences among treatments at  $p < 0.05$ . Treatments with A letter were considered with values similar to C group.

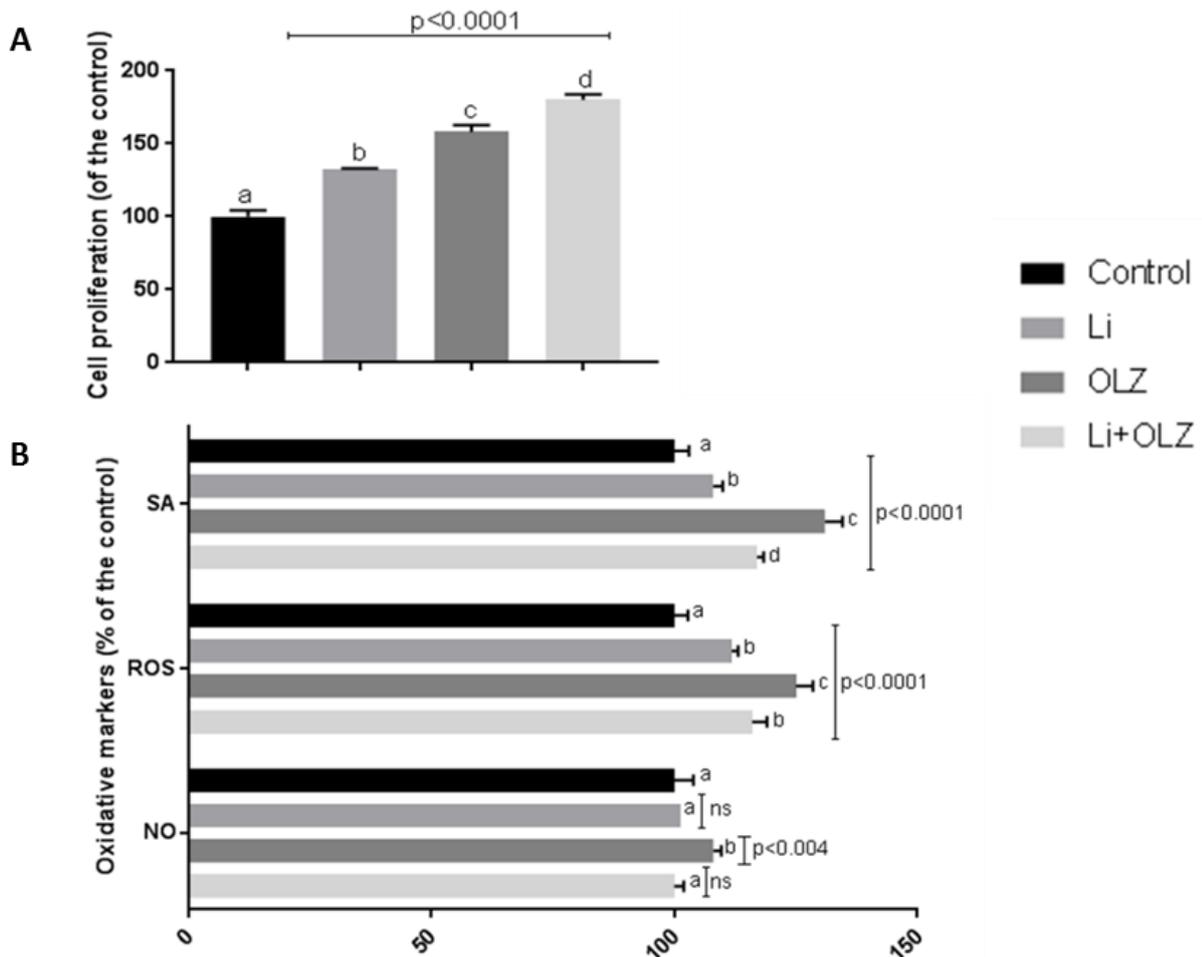
From this first analysis, OLZ at 0.03  $\mu\text{g}/\text{mL}$  concentration was chosen to conduct complementary protocols, since this concentration increased cell proliferation and was into the plasmatic therapeutic range of this drug. Complementary analysis was performed to confirm that this concentration could trigger macrophage activation by evaluation of cell cycle modulation and cytomorphological macrophage patterns in 72h cell cultures (Fig 2). Macrophages OLZ-exposed presented higher frequency of S-phase cells than C-group. This effect was higher than cells just PHA-exposed, that is a natural antigen used to trigger *in vitro* macrophage inflammatory activation. OLZ-exposure also increased frequency of G2/M cells than C-group, whereas cells PHA-exposed presented significant lower frequency of cells in this phase than C-group. Both, PHA and OLZ caused macrophage spreading pattern in monolayer cultures that indicate an inflammatory state.



**Fig 2.** Comparison of cell cycle determined by flow cytometry analysis among RAW macrophages 72 h cultures exposed OLZ (OLZ) at 0.03  $\mu\text{g}/\text{mL}$  concentration and to Phytohaemagglutinin (PHA), an natural antigen that trigger inflammatory macrophages activation. (A) Representative graphics with cell phases: (G0/G1 = gap 1; S = synthesis; G2/M = gap2 and mitosis). (B) % of cells the control in at each stage (G0/G1 = gap 1; S = synthesis; G2/M = gap2 and mitosis) of the cell cycle compared by One-way analysis of variance (ANOVA) , followed by the Tukey *post hoc* test. The different letters (i.e., A, B, C, D, E, F) indicate statistical differences in each treatment at  $p < 0.05$ . (C) Monolayer culture pattern of RAW macrophages microscopic optic analysis ( $\times 40$ , scale bar= $20 \mu\text{m}$ ) in control (C) cells and cells exposed to OLZ and PHA. No-activated C-cells presented higher frequency of spheric cells typical of monocytes.

Cells PHA and OLZ exposed presenting a macrophage spreading pattern that is observed in inflammatory-activated cells.

Further, RAW cells were concomitantly exposed with OLZ at this concentration and Li at 0.7 mEq/L concentration, an anti-inflammatory drug (Fig 3A). All treatments increased cellular proliferation compared to the control group and proliferation was highest in cells exposed to OLZ plus Li. Modulation of oxidative markers that are involved with inflammatory processes were also evaluated (Fig 3B). All treatments increased SA and ROS levels than C group. However, this effect was more pronounced in cells just OLZ- treated. Therefore, it seems that Li attenuated OLZ oxidative effects on macrophage cells. Just cells OLZ-exposed presented higher NO levels than C group, including cells concomitantly OLZ and Li-treated.



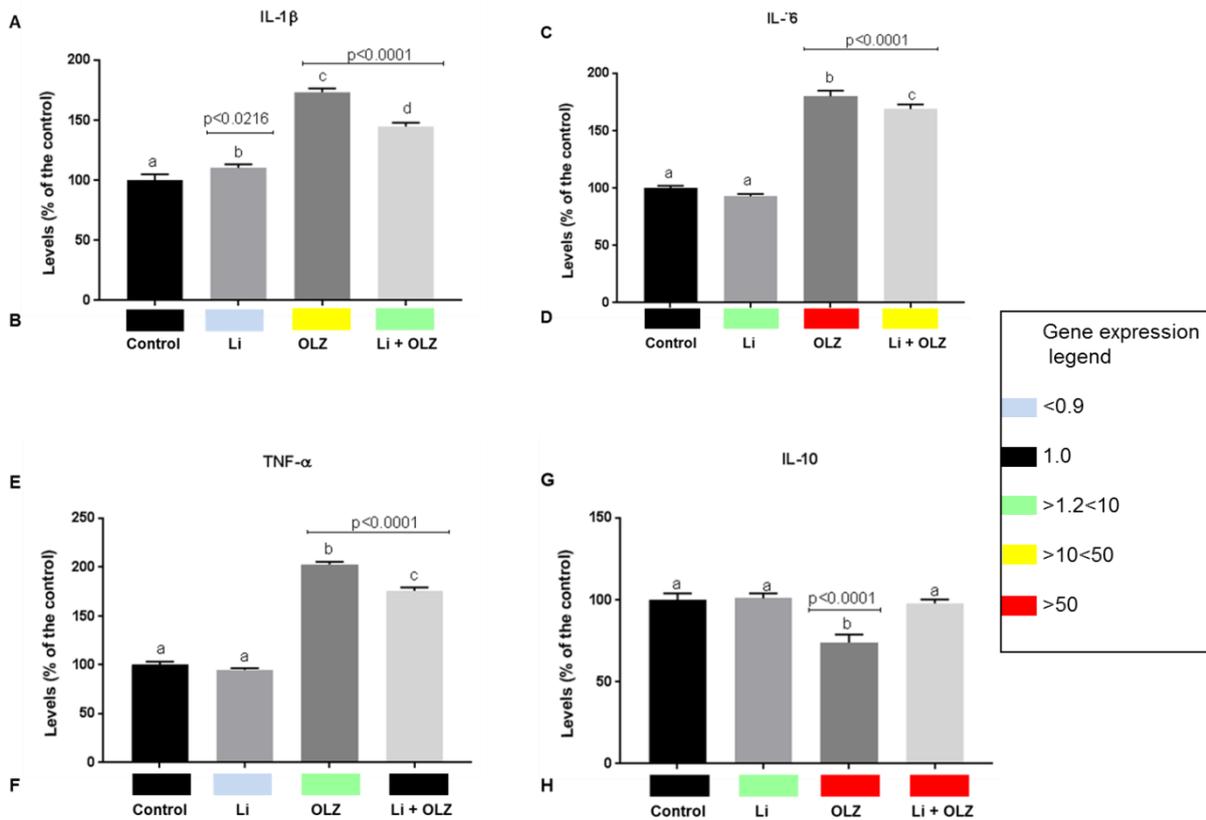
**Fig 3.** Interaction between OLZ (0.03  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and Li (0.7 mEq/L) on proliferation (A) and modulation of oxidative markers superoxide anion (SA), reactive oxygen species (ROS), and nitric oxide (NO) (B). Treatments were compared by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Tukey post hoc test. The different letters (i.e., A, B, C, D) indicate statistical differences in each treatment at  $p < 0.05$ . Treatments identified with A-letter were statistically similar to untreated-cells group (C).

Analysis of gene and protein expression of four inflammatory cytokine markers among treatments was also performed and results are presented in Fig 4. Cells just OLZ treated presented higher protein levels of IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  pro-inflammatory cytokines (Figure 4). On the other hand, cells on this treatment presented lower levels of IL-10, an anti-inflammatory cytokine. OLZ induced gene overexpression of IL-1 $\beta$ , IL-

6 and IL-10 cytokines. Therefore, the role of results indicated OLZ pro-inflammatory effect on RAW cells.

At contrary, cells just Li-exposed presented similar levels of IL-6, TNF- $\alpha$  and IL-10 cytokines than C non-activated macrophages group. However, a slight, but significant increase of IL-1 $\beta$  was observed in cells just Li-exposed t than C-group. Despite these results, IL-1 $\beta$ , as well as TNF- $\alpha$  gene expression were downregulated by Li-exposure. Both IL-6 and IL-10 genes were overexpressed in cells just Li-exposed.

Interaction between OLZ and Li showed a decrease on IL- $\beta$ , IL-6 and TNF $\alpha$  protein levels than cells just OLZ-exposed. However, levels of these cytokines were still significantly higher than C-group. Despite, IL- $\beta$  and IL-6 genes to be overexpressed in cells concomitantly OLZ and Li exposed, this effect was more attenuated in comparison with cells just OLZ-exposed. In the presence Li, cells OLZ exposed presented similar TNF $\alpha$  gene expression than control group. IL-10 gene was also overexpressed in this treatment than C-group.



**Fig 4.** Modulation of protein and gene expression cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ , IL-10) involved with inflammatory response of RAW macrophages exposed to OLZ (OLZ, 0.03  $\mu$ g/mL) and Li (Li, 0.7 mEq/L). Treatments were compared by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Tukey post hoc test. The different letters (i.e., A, B, C, D) indicate statistical differences in each treatment at  $p < 0.05$ . Treatments with A letter were considered with values similar to control untreated-cells group. Gene expression of each cytokine in each treatment is represented by colored squares (black = gene expression similar to C-group; green square = gene overexpression  $\geq 1.2 < 10$  times than C-group; yellow square = gene overexpression  $\geq 10 < 50$  times than C-group; red square = gene overexpression  $\geq 50$  times than C-group). The beta-actin housekeeping was used as internal control to normalized gene expression analysis among treatments.

## Discussion

The present *in vitro* study evaluated the potential anti-inflammatory action of Li on pro-inflammatory response in macrophage cells triggered by the antipsychotic drug OLZ. The results suggest that Li may partially reverse the inflammatory response caused by OLZ on macrophage cells. Based on these general results it is important to consider theoretical and methodological limitations.

In the first analysis performed here an OLZ curve-concentration showed a hormetic effect of this antipsychotic drug on macrophages. In fact, concentrations in to plasmatic therapeutic range of OLZ showed increase on macrophage proliferation, whereas concentrations  $> 1 \mu\text{g/mL}$  decreased significantly cellular proliferation than C-group. These results could indicate potential cytotoxic or immunosuppressive effect of OLZ on macrophages cells. Actually, previous studies reported potential apoptosis induction of OLZ on hamster pancreatic  $\beta$  cell line with marked apoptotic events on these cells. This action could explain potential pro-diabetic effect associate with OLZ administration [31]. Pessina et al [32] also described potential cytotoxic effect of high OLZ concentration on macrophages. However, main focus of the present study was clarifying potential interaction between OLZ and Li, that has some anti-inflammatory properties. For this reason, complementary analysis involving analysis of OLZ on apoptosis modulation was not performed here. Perhaps, complementary studies about this issue could be performed, since some recent investigations, such as performed by Sanomachi et al [33] have described potential beneficial OLZ effect on cancer patients by down-regulation of survivin, which has been implicated in multidrug chemoresistance and apoptosis induction.

Investigations of OLZ effects on inflammatory modulation are relatively incipient. In RAW 264.7 macrophage cells we found a potential important hormetic

effect on inflammatory response observed by cellular proliferation rates (Fig 1). This hormetic OLZ effect could explain differences between results found here and other studies published recently in the literature, such as performed by Stapel et al [34]. These authors showed that when human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) obtained from healthy adults were *in vitro* exposed to  $10^{-4}$  M OLZ occurred decreasing in mRNA and protein levels of IL-1 $\beta$ , IL-6, and TNF- $\alpha$  than control group, at 72 h cell cultures. However, the OLZ concentration (31.24  $\mu$ g/mL) used by authors was thousand times greater than concentration tested here (0.03  $\mu$ g/mL), that is into therapeutic plasmatic OLZ concentration range [24]. In fact, we think that in an *in vitro* protocol the use of OLZ at a plasmatic therapeutic concentration could be more realistic considering pharmacokinetics of this drug. Into the body, OLZ is metabolized by cytochrome P450 and more than 40% of the oral doses is removed by the hepatic first-pass effect. In these terms, it is not expected that high OLZ concentrations arrive in peripheral body cells including macrophages.

Previous evidence suggested that immune system alteration associated with OLZ treatment may contribute to antipsychotic-induced weight gain [35]. Inflammatory effects of OLZ have not been well-characterized. However, in light of recent findings that OLZ may induce inflammatory signaling, it is possible that concomitant use of OLZ with anti-inflammatory drugs may attenuate pro-inflammatory effects of OLZ. In psychiatric practice use of Li, which exerts anti-inflammatory effects via inhibitor of GSK-3, is common [36].

Studies examining the beneficial effects of Li in combination with OLZ may help to understand the increase in efficacy of treatment of some psychiatric symptoms conferred by combination therapies. Clinical studies have demonstrated that concomitant treatment with OLZ and Li reduced rehospitalization risk after a manic

episode [20,37]. Moreover, previous studies have shown that coadministration of melatonin with OLZ and Li in adolescents with Bipolar Disorder may reduce weight gain associated with OLZ treatment [38]. The beneficial effects of coadministration demonstrated in these studies provided justification for our evaluation of effects of OLZ and Li on oxidative and inflammatory metabolism.

Evaluation of *in vitro* interactions of OLZ and Li was carried out by treatment of cells at concentrations in the recommended therapeutic plasma range. The range evaluated for OLZ was 0.02 µg/mL to 0.08 µg/mL according to guidelines of drug therapeutic monitoring [39]. The therapeutic Li concentration used was 0.07 mEq/L, which has been previously evaluated *in vitro* [21,22]. Therefore, results of this study may be representative of interactive *in vivo* effects between OLZ and Li.

Previous studies have consistently supported the hypothesis that ox-inflammatory effects of OLZ administration are associated with metabolic side effects [13,16,18]. In addition, anti-inflammatory properties of Li are also well-characterized and seem to contribute to reduction in frequency of manic episodes in bipolar patients [35,40]. However, potential effects of interaction between OLZ and Li on metabolic side effects are not clear. For example, the study performed by Katagiri et al. [41] suggested no direct impact of Li treatment on OLZ side effects. In contrast, we demonstrated that cotreatment with OLZ and Li resulted in decreased pro-inflammatory cytokines and increased levels of IL-10, an anti-inflammatory cytokine.

Our results are placed in appropriate context by considering functional aspects of macrophages in relation to inflammatory response. Macrophages present two distinct phenotypic subtypes: classically and alternatively activated macrophages. Classically activated, or M1, macrophages are pro-inflammatory and polarized by antigens such as lipopolysaccharide (LPS) and PHA, resulting in production of pro-

inflammatory cytokines such as interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-6, IL-12, IL-23, and TNF- $\alpha$ . Conversely, alternatively activated, or M2, macrophages are anti-inflammatory and immunoregulatory cells polarized by Th2 cytokines such as IL-4 and IL-13. M2 cells also produce anti-inflammatory cytokines such as IL-10 and TGF- $\beta$ . The role of M1/M2 macrophage polarization balance in organ response to inflammation or injury has been well-established [42].

When inflammation is triggered macrophages first exhibit the M1 phenotype, releasing mainly IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , and IL-12 in response. As the M1 phase continues, damage may occur. Higher levels of pro-inflammatory cytokines indicate a more intense inflammatory response by M1 macrophages. Conversion to the M2 phenotype associated with increased release of anti-inflammatory cytokines such as IL-10 is crucial in resolution of the pro-inflammatory state. M2 macrophages are able to suppress inflammation, contributing to tissue repair, remodeling, vasculogenesis, and maintenance of homeostasis [42].

Activated macrophages cultured for 72 h exposed to a single antigen were expected to produce higher levels of pro-inflammatory cytokines. However, we also observed increased anti-inflammatory cytokines. Anti-inflammatory cytokines produced by activated macrophages may influence macrophage inflammatory response in three ways: (1) M1 phenotype suppression in the presence of an antigen molecule; (2) decreased production of pro-inflammatory cytokines; (3) faster conversion from M1 to M2 phenotype [42].

As cytokine protein and gene expression are the best markers for determination of macrophage polarization, our results showed that M1 polarization of RAW 264.7 macrophages were greatly attenuated by Li treatment, as levels of most cytokines remained similar to the untreated group. In contrast, clear M1 polarization

was observed in OLZ-treated macrophages, and this inflammatory response was partially attenuated by administration of Li. These results support the hypothesis that Li may attenuate the inflammatory cascade triggered by the antipsychotic drug OLZ.

Of note, macrophages treated with only Li showed greater cellular proliferation and slightly higher IL-1 $\beta$  levels than control. Based on previous studies, slight macrophage activation may occur in response to Li because the RAW 264.7 macrophage cell line is very sensitive to chemical changes in culture medium [43]. Therefore, these results may represent a limitation of this *in vitro* model rather than a true effect of Li on macrophage activation.

Our results also showed an effect of cotreatment with Li and OLZ on oxidative metabolism markers associated with the inflammatory process. Cells exposed only to OLZ produced higher levels of superoxide, ROS, and NO. However, Li attenuated levels OLZ-induced oxidative markers. Of particular interest is the effect of OLZ treatment on NO levels, as NO is an important pleiotropic signaling molecule. NO induces concentration-dependent enhancement of endothelial cell proliferation, angiogenesis, and acceleration of wound healing. Conversely, NO is an oxidative molecule, and may also contribute to induce inflammation [44].

In addition to increased production of pro-inflammatory cytokines, M1 macrophages produce increased NO via inducible nitric oxide synthase (iNOS) [44]. In contrast, M2 macrophages are characterized by expression of the enzyme arginase, which hydrolyzes arginine to ornithine and urea. This reaction limits arginine availability for NO synthesis [45]. Therefore, analysis of NO levels may indicate phenotype of macrophage cells. Cotreatment with OLZ and Li significantly decreased NO levels, supporting the hypothesis that Li may attenuate the pro-inflammatory effect triggered by OLZ.

Decreased ROS levels in macrophages in response to cotreatment with OLZ and Li highlights the benefit of this interaction on the inflammatory pathway since accumulating evidence supports the hypothesis that redox signaling plays a role in macrophage polarization [46]. Moreover, elevation of ROS by OLZ results from changes in mitochondrial functioning suggesting that Li may act on mitochondria. However, this presumption is still speculative since we did not perform direct assays of potential mitochondrial dysfunction triggered by OLZ exposure. Despite this methodological limitation, it is important to point out that some previous studies have suggested that antipsychotic effects on metabolism may be associated with alteration of mitochondrial function. This alteration, associated with a chronic inflammatory state, may contribute to development of metabolic syndrome in patients that use antipsychotic drugs [47, 48].

This presumption is corroborated by a recent study performed by Scani et al [49] using peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from schizophrenic patients exposed to antipsychotic drugs. Results from this study showed that these drugs may induce mitochondrial dysfunction. Mitochondria are key organelles responsible for energy production and control many processes from signaling to cell death. The function of the mitochondrial electron transport chain is coupled with production of ROS in the form of superoxide anion and hydrogen peroxide. Mitochondrial ROS overproduction and changes in mitochondrial redox homeostasis are involved in a number of neurological and somatic conditions [50].

As OLZ treatment of macrophages increased superoxide and ROS, which includes hydrogen peroxide, these results indirectly suggest that this drug may cause mitochondrial dysfunction. Attenuation of ROS production by Li exposure may be possible as described in an investigation performed by Kim et al [51]. This study

demonstrated that mitochondrial dysfunction and lipid peroxidation in rat frontal cortex triggered by chronic NMDA administration was partially reversed by Li treatment. In humans, Souza et al [52] showed that BD patients treated for six weeks with Li had reduced mitochondrial dysfunction in Complex 1 of the electron transport chain.

Despite limitations and constraints related to *in vitro* studies, our results highlight potential for use of Li as an additional therapeutic approach in the prevention of oxidative and inflammatory effects triggered by OLZ. However, further studies are needed to clarify the mechanisms involved in the protective effect of Li on OLZ-induced inflammatory response and the impact Li may have on the prevention of metabolic syndrome in patients treated with second generation antipsychotics drugs.

## **Conclusion**

Concomitant *in vitro* macrophage exposure to OLZ and Li suggests that Li may attenuate oxidation and inflammation. It can be inferred that concomitant use of OLZ may contribute to attenuation of some side effects triggered by OLZ administration.

## **Disclosure of Interest**

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas.

## **Acknowledgments**

The authors gratefully acknowledge “Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)”, “Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de

Nível Superior (CAPES)” and “Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM)” for Brazilian financial support (grants and fellowships).

## Author Contributions

**Marcelo Soares Fernandes:** Conceptualization, Resources, Data Curation, Formal Analysis, Investigation, Methodology, Validation, Writing – Original Draft Preparation

**Fernanda Barbisan:** Conceptualization, Resources, Data Curation, Formal Analysis, Investigation, Methodology, Validation, Writing – Original Draft Preparation

**Verônica Farina Azzolin:** Conceptualization, Investigation, Methodology, Validation.

**Pedro Antônio Schmidt do Prado-Lima:** Conceptualization, Investigation, Validation, Writing – Original Draft Preparation

**Cibele Ferreira Teixeira:** Conceptualization, Investigation, Methodology, Validation.

**Ivo Emílio da Cruz Jung:** Conceptualization

, Investigation, Methodology, Validation.

**Charles Elias Assmann:** Investigation, Methodology.

**Rogério Tomasi Riffel:** Supervision, Investigation

**Marta Maria Medeiros Frescura Duarte:** Investigation, Methodology.

**Ednea Maia Aguiar-Ribeiro:** Conceptualization, Funding Acquisition.

**Ivana Beatrice Mânica da Cruz:** Conceptualization, Resources, Data Curation, Formal Analysis, Investigation, Methodology, Validation, Writing – Original Draft Preparation, Writing – Review & Editing.

## References

1. Komossa K, Rummel-Kluge C, Hunger H, Schwarz S, Bhoopathi PS, Kissling W, et al. Ziprasidone versus other atypical antipsychotics for schizophrenia. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2009. doi: 10.1002/14651858.CD006654.pub2
2. Verdolini N, Hidalgo-Mazzei D, Murru A, Pacchiarotti I, Samalin L, Young AH, et al. Mixed states in bipolar and major depressive disorders: systematic review and quality appraisal of guidelines. *Acta Psychiatr. Scand.* 2018; 138:196-222. doi: 10.1111/acps.12896
3. Lindström L, Lindström E, Nilsson M, Höistad M Maintenance therapy with second generation antipsychotics for bipolar disorder - A systematic review and meta-analysis. *J Affect Disord.* 2017; 213:138-150. doi: 10.1016/j.jad.2017.02.012
4. Farlow MR, Shamlivan TA. Benefits and harms of atypical antipsychotics for agitation in adults with dementia. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2017; 27:217-231. doi: 10.1016/j.euroneuro.2017.01.002.
5. Dale M, van Duijn E. Anxiety in Huntington's Disease. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.* 2015;27:262-71. doi: 10.1176/appi.neuropsych.14100265.
6. Spertus J, Horvitz-Lennon M, Abing H, Normand SL. Risk of weight gain for specific antipsychotic drugs: a meta-analysis. *NPJ Schizophr.* 2018;4:12. doi: 10.1038/s41537-018-0053-9.
7. Flank J, Schechter T, Gibson P, Johnston DL, Orsey AD, Portwine C, et al. Olanzapine for prevention of chemotherapy-induced nausea and vomiting in children and adolescents: a multi-center, feasibility study. *Support Care Cancer.* 2018; 26:549-555. doi: 10.1007/s00520-017-3864-8.
8. Yoodee J, Permsuwan U, Nimworapan M. Efficacy and safety of olanzapine for the prevention of chemotherapy-induced nausea and vomiting: A systematic review and meta-analysis. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2017;112:113-125. doi: 10.1016/j.critrevonc.2017.02.017.

9. Fernø J, Ersland KM, Duus IH, González-García I, Fossan KO, Berge RK, Steen VM, Skrede S. Olanzapine depot exposure in male rats: Dose-dependent lipogenic effects without concomitant weight gain. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2015; 25:923-32. doi: 10.1016/j.euroneuro.2015.03.002.
10. Rojo LE, Gaspar PA, Silva H, Risco L, Arena P, Cubillos-Robles K, Jara B. Metabolic syndrome and obesity among users of second generation antipsychotics: A global challenge for modern psychopharmacology. *Pharmacol Res.* 2015;101:74-85. doi: 10.1016/j.phrs.2015.07.022.
11. Cildir G, Akincilar SC, Tergaonkar V. Chronic adipose tissue inflammation: all immune cells on the stage. *Trends Mol Med.* 2013;19:487-500. doi: 10.1016/j.molmed.2013.05.001.
12. Victoriano M, de Beaupaire R, Naour N, Guerre-Millo M, Quignard-Boulangé A, Huneau JF, Mathé V, Tomé D, Hermier D. Olanzapine-induced accumulation of adipose tissue is associated with an inflammatory state. *Brain Res.* 2010;1350:167-75. doi: 10.1016/j.brainres.2010.05.060.
13. Sárvári AK, Veréb Z, Uray IP, Fésüs L, Balajthy Z. Atypical antipsychotics induce both proinflammatory and adipogenic gene expression in human adipocytes in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014; 450:1383-9. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.07.005.
14. Davey KJ, O'Mahony SM, Schellekens H, O'Sullivan O, Bienenstock J, Cotter PD, Dinan TG, Cryan JF. Gender-dependent consequences of chronic olanzapine in the rat: effects on body weight, inflammatory, metabolic and microbiota parameters. *Psychopharmacology (Berl).* 2012; 221:155-69. doi: 10.1007/s00213-011-2555-2
15. Zhang Q, He M, Deng C, Wang H, Huang XF. Effects of olanzapine on the elevation of macrophage infiltration and pro-inflammatory cytokine expression in female rats. *J Psychopharmacol.* 2014; 28:1161-9. doi: 10.1177/0269881114555250.
16. Calevro A, Cotel MC, Natesan S, Modo M, Vernon AC, Mondelli V. Effects of chronic antipsychotic drug exposure on the expression of Translocator Protein and inflammatory markers in rat adipose tissue. *Psychoneuroendocrinology.* 2018;95: 28–33. doi: 10.1016/j.psyneuen.2018.05.021.

17. Cui D, Peng Y, Zhang C, Li Z, Su Y, Qi Y, Xing M, Li J, Kim GE, Su KN, Xu J, Wang M, Ding W, Piecychna M, Leng L, Hirasawa M, Jiang K, Young L, Xu Y, Qi D, Bucala R. Macrophage migration inhibitory factor mediates metabolic dysfunction induced by atypical antipsychotic therapy. *J Clin Invest.* 2018; 128:4997-5007. doi: 10.1172/JCI93090
18. Jeon SW, Kim YK. Unresolved Issues for Utilization of Atypical Antipsychotics in Schizophrenia: Antipsychotic Polypharmacy and Metabolic Syndrome. *Int J Mol Sci.* 2017;18. pii: E2174. doi: 10.3390/ijms18102174.
19. Finley PR. Drug Interactions with Lithium: An Update. *Clin Pharmacokinet.* 2016; 55:925-41. doi: 10.1007/s40262-016-0370-y.
20. Atkin T, Nuñez N, Gobbi G. Practitioner Review: The effects of atypical antipsychotics and mood stabilisers in the treatment of depressive symptoms in paediatric bipolar disorder. *J Child Psychol Psychiatry.* 2017; 58:865-879. doi: 10.1111/jcpp.12735.
21. Barbisan F, Azzolin VF, Teixeira CF, Mastella MH, Ribeiro EE, do Prado-Lima PAS, et al. Xanthine-Catechin Mixture Enhances Lithium-Induced Anti-Inflammatory Response in Activated Macrophages In Vitro. *Biomed Res Int.* 2017; 2017:4151594. doi: 10.1155/2017/4151594
22. Barbisan F, Azzolin VF, Monteiro GC, Teixeira CF, Mastella MH, Bueno V, Duarte MMMF, Wagner G, do Prado-Lima PAS, Ribeiro EE, da Cruz IBM. Genetic or pharmacological superoxide-hydrogen peroxide imbalances modulate the in vitro effects of lithium on glycogen synthase kinase-3 $\beta$ . *Gene.* 2018; 655:48-55. doi: 10.1016/j.gene.2018.02.046.
23. Duarte T, Barbisan F, do Prado-Lima PAS, Azzolin VF, da Cruz Jung IE, Duarte MMMF, Teixeira CF, Mastella MH, da Cruz IBM. Ziprasidone, a second-generation antipsychotic drug, triggers a macrophage inflammatory response in vitro. *Cytokine.* 2018; 106:101-107. doi: 10.1016/j.cyto.2017.10.017.
24. Mauri MC, Paletta S, Di Pace C, Reggiori A, Cirnigliaro G, Valli I, Altamura AC. Clinical Pharmacokinetics of Atypical Antipsychotics: An Update. *Clin Pharmacokinet.* 2018; doi: 10.1007/s40262-018-0664-3

25. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65: 55–63.
26. Azzolin VF, Cadoná FC, Machado AK, Berto MD, Barbisan F, Dornelles EB, et al. Superoxide-hydrogen peroxide imbalance interferes with colorectal cancer cells viability, proliferation and oxaliplatin response. *Toxicol Vitr*. 2016;32: 8–15. doi: 10.1016/j.tiv.2015.12.001.
27. Morabito G, Trombetta D, Singh Brajendra K, Prasad Ashok K, Parmar Virinder S, Naccari C, Mancari F, Saija A, Cristani M, Firuzi O, Saso L. Antioxidant properties of 4-methylcoumarins in in vitro cell-free systems. *Biochimie*. 2010; 92:1101-7. doi: 10.1016/j.biochi.2010.04.017.
28. Costa F, Barbisan F, Assmann CE, Araújo NKF, de Oliveira AR, Signori JP, et al. Seminal cell-free DNA levels measured by PicoGreen fluorochrome are associated with sperm fertility criteria. *Zygote*. 2017; 25:111-119. doi: 10.1017/S0967199416000307.
29. da Cruz Jung IE, Machado AK, da Cruz IB, Barbisan F, Azzolin VF, Duarte T, Duarte MM, do Prado-Lima PA, Bochi GV, Scola G, Moresco RN. Haloperidol and Risperidone at high concentrations activate an in vitro inflammatory response of RAW 264.7 macrophage cells by induction of apoptosis and modification of cytokine levels. *Psychopharmacology (Berl)*. 2016; 233:1715-23. doi: 10.1007/s00213-015-4079-7.
30. Pamies, A. Bal-Price, A. Simeonov, D. Tagle, D. Allen, D. Gerhold, D. et al. Good cell culture practice for stem cells & stem-cell-derived models. *ALTEX*. 2018; 35:353-378. doi: 10.14573/altex.1710081.
31. Ozasa R, Okada T, Nadanaka S, Nagamine T, Zyryanova A, Harding H et al. The antipsychotic olanzapine induces apoptosis in insulin-secreting pancreatic  $\beta$  cells by blocking PERK-mediated translational attenuation. *Cell Struct Funct*. 2013;38:183-95. doi.org/10.1247/csf.13012
32. Pessina A, Turlizzi E, Bonomi A, Guizzardi F, Cavicchini L, Croera C et al. In vitro toxicity of clozapine, olanzapine, and quetiapine on granulocyte-macrophage progenitors (GM-CFU). *Pharmacopsychiatry*. 2006 Jan;39(1):20-2. Erratum in: *Pharmacopsychiatry*. 2006; 39:160.

33. Sanomachi T, Suzuki S, Kuramoto K, Takeda H, Sakaki H, Togashi K et al. Olanzapine, an Atypical Antipsychotic, Inhibits Survivin Expression and Sensitizes Cancer Cells to Chemotherapeutic Agents. *Anticancer Res.* 2017 Nov;37(11):6177-6188.
34. Stapel B, Sieve I, Falk CS, Bleich S, Hilfiker-Kleiner D, Kahl KG. Second generation atypical antipsychotics olanzapine and aripiprazole reduce expression and secretion of inflammatory cytokines in human immune cells. *J Psychiatr Res.* 2018;105:95-102. doi: 10.1016/j.jpsychires.2018.08.017.
35. Fonseka TM, Müller DJ, Kennedy SH. Inflammatory Cytokines and Antipsychotic-Induced Weight Gain: Review and Clinical Implications. *Mol Neuropsychiatry.* 2016; 2:1-14. doi: 10.1159/000441521.
36. Beurel E, Grieco SF, Jope RS. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): regulation, actions, and diseases. *Pharmacol Ther.* 2015; 148:114-31. doi: 10.1016/j.pharmthera.2014.11.016.
37. Wingård L, Bodén R, Brandt L, Tiihonen J, Tanskanen A, Kieler H et al. Reducing the rehospitalization risk after a manic episode: A population based cohort study of lithium, valproate, olanzapine, quetiapine and aripiprazole in monotherapy and combinations. *J Affect Disord.* 2017; 217:16-23. doi: 10.1016/j.jad.2017.03.054. Epub 2017 Mar 27.
38. Mostafavi SA, Solhi M, Mohammadi MR, Akhondzadeh S. Melatonin for Reducing Weight Gain Following Administration of Atypical Antipsychotic Olanzapine for Adolescents with Bipolar Disorder: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *J Child Adolesc Psychopharmacol.* 2017; 27:440-444. doi: 10.1089/cap.2016.0046.
39. Mauri MC, Paletta S, Di Pace C, Reggiori A, Cirnigliaro G, Valli I, Altamura AC. Clinical Pharmacokinetics of Atypical Antipsychotics: An Update. *Clin Pharmacokinet.* 2018. doi: 10.1007/s40262-018-0664-3.
40. Machado-Vieira R. Lithium, Stress, and Resilience in Bipolar Disorder: Deciphering this key homeostatic synaptic plasticity regulator. *J Affect Disord.* 2018; 233:92-99. doi: 10.1016/j.jad.2017.12.026.

41. Katagiri H, Takita Y, Tohen M, Higuchi T, Kanba S, Takahashi M. Safety and efficacy of olanzapine monotherapy and olanzapine with a mood stabilizer in 18-week treatment of manic/mixed episodes for Japanese patients with bipolar I disorder. *Curr Med Res Opin.* 2012;28:701-13. doi: 10.1185/03007995.2012.666961.
42. Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, Taghadosi M, Esmaeili SA, Mardani F, et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J Cell Physiol.* 2018; 233:6425-6440. doi: 10.1002/jcp.26429.
43. Berghaus LJ, Moore JN, Hurley DJ, Vandenplas ML, Fortes BP, Wolfert MA, et al. Innate immune responses of primary murine macrophage-lineage cells and RAW 264.7 cells to ligands of Toll-like receptors 2, 3, and 4. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2010;33:443-54. doi: 10.1016/j.cimid.2009.07.001.
44. Rath M, Müller I, Kropf P, Closs EI, Munder M. Metabolism via Arginase or Nitric Oxide Synthase: Two Competing Arginine Pathways in Macrophages. *Front Immunol.* 2014; 5:532. doi: 10.3389/fimmu.2014.00532.
45. Juhas U, Ryba-Stanisławowska M, Szargiej P, Myśliwska J. Different pathways of macrophage activation and polarization. *Postepy Hig Med Dosw (Online).* 2015; 69:496-502. doi: 10.5604/17322693.1150133.
46. Tan HY, Wang N, Li S, Hong M, Wang X, Feng Y. The Reactive Oxygen Species in Macrophage Polarization: Reflecting Its Dual Role in Progression and Treatment of Human Diseases. *Oxid Med Cell Longev.* 2016; 2016:2795090. <https://doi.org/10.1155/2016/2795090>.
47. Baig MR, Navaira E, Escamilla MA, Raventos H, Walss-Bass C. Clozapine treatment causes oxidation of proteins involved in energy metabolism in lymphoblastoid cells: a possible mechanism for antipsychotic-induced metabolic alterations. *J Psychiatr Pract.* 2010; 16:325-33. doi: 10.1097/01.pra.0000388627.36781.6a.
48. Contreras-Shannon V1, Heart DL, Paredes RM, Navaira E, Catano G, Maffi SK, Walss-Bass C. Clozapine-induced mitochondria alterations and inflammation in brain and insulin-responsive cells. *PLoS One.* 2013; 8:e59012. doi: 10.1371/journal.pone.0059012.

49. Scaini G, Quevedo J, Velligan D, Roberts DL, Raventos H, Walss-Bass C. Second generation antipsychotic-induced mitochondrial alterations: Implications for increased risk of metabolic syndrome in patients with schizophrenia. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2018 28(3): 369-380. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2018.01.004>
50. Angelova PR, Abramov AY. Role of mitochondrial ROS in the brain: from physiology to neurodegeneration. *FEBS Lett.* 2018; 592:692-702. doi: 10.1002/1873-3468.12964.
51. Kim HK, Isaacs-Trepanier C, Elmi N, Rapoport SI, Andreazza AC. Mitochondrial dysfunction and lipid peroxidation in rat frontal cortex by chronic NMDA administration can be partially prevented by lithium treatment. *J Psychiatr Res.* 2016; 76:59-65. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2016.02.001>.
52. de Sousa RT, Streck EL, Zanetti MV, Ferreira GK, Diniz BS, Brunoni AR, et al. Lithium increases leukocyte mitochondrial complex I activity in bipolar disorder during depressive episodes. *Psychopharmacology (Berl).* 2015; 232:245-50. doi: 10.1007/s00213-014-3655-6.



## 5 ARTIGO 2 - AÇAÍ (*EUTERPE OLERACEA* MART.) MODULATES *IN VITRO* PRO-INFLAMMATORY RESPONSE INDUCED BY OLANZAPINE, AN ANTIPSYCHOTIC DRUG

**Full title:** Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) modulates *in vitro* pro-inflammatory response induced by olanzapine, an antipsychotic drug

**Short title:** Açaí modulates pro-inflammatory response induced by olanzapine

Marcelo Soares Fernandes<sup>1,2</sup>, Charles Elias Assmann<sup>3</sup>, Fernanda Barbisan<sup>4</sup>, Verônica Farina Azzolin<sup>4</sup>, Alencar Kolinski Machado<sup>5</sup>, Marta Maria Medeiros Frescura Duarte<sup>1,6</sup>, Pedro Antônio Schmidt do Prado-Lima<sup>7</sup>, Rogerio Tomasi Riffel<sup>2,8</sup>, Cibele Ferreira Teixeira<sup>1</sup>, Francine Carla Cadoná<sup>9</sup>, Euler Esteves Ribeiro<sup>10</sup>, Ivana Beatrice Mânica da Cruz<sup>1,3,4\*</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

<sup>2</sup> Universidade Federal da Fronteira Sul, Passo Fundo, RS, Brazil

<sup>3</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

<sup>4</sup> Programa de Pós-Graduação em Gerontologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

<sup>5</sup> Centro Universitário Franciscano, Santa Maria, RS, Brazil

<sup>6</sup> Universidade Luterana do Brasil, Santa Maria, RS, Brazil

<sup>7</sup> Instituto do Cérebro, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>8</sup> Hospital da Cidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS, Brazil

<sup>9</sup> Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde, Universidade do Oeste de Santa Catarina, Joaçaba, SC, Brazil

<sup>10</sup> Fundação Universidade Aberta de Terceira Idade, Manaus, AM, Brazil.

\* Corresponding author at: Universidade Federal de Santa Maria, 1000 Roraima Av., Building 19, Room 3101/3102, Zip Code: 97105-900, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil. E-mail address: ivana.ufsm@gmail.com (I. B. M. Cruz).

## **Abstract**

### **Purpose:**

Açaí (*Euterpe oleracea* Mart), a Brazilian fruit, is considered a “superfruit” due its energetic properties and others. The açaí’s anti-inflammatory effects may attenuate undesirable side metabolic and pro-inflammatory effects triggered by some antipsychotic drugs, such as Olanzapine (OLZ). It is possible to suggest that açaí’s supplement could potentially minimize OLZ adverse effects. Therefore, the aim of the study was to verify whether the hydroalcoholic extract of açaí can modulate the oxy-inflammatory response of olanzapine *in vitro*.

**Methodology:** to test this hypothesis was performed an *in vitro* protocol using RAW 264.7 macrophages with oxidative and inflammatory cascade activated by OLZ, and concomitantly supplemented at different concentrations with açaí hydroalcoholic extract previously chemically characterized.

**Results:** From a preliminary analysis, the açaí extract at 5 mg/mL presented higher activity against inflammatory status triggered by OLZ (0.03 µg/mL). At this concentration açaí was able to reduce several oxidative and inflammatory markers triggered by OLZ (0.03 µg/mL) exposure such as: nitric oxide (NO), reactive oxygen species (ROS), and pro-inflammatory cytokines levels (IL-1β, IL-6, TNF-α, IFN-γ) caused by OLZ (0.03 µg/mL). Moreover, açaí reverted the levels of anti-inflammatory cytokine IL-10 that were dropped by OLZ exposure.

**Conclusions:** The whole of results open perspective to development of açaí- supplement to mitigate oxidative and inflammatory effects triggered by OLZ.

**Keywords:** Amazon fruit; Inflammation; Oxidative stress.

## Introduction

Amazonian tropical rainforest region has a large diversity of fruits that are habitually consumed by native population. Some fruits became popular around the world, such as açai (*Euterpe oleraceae*, Mart.), that is considered a “superfruit” due its energetic propertiers. [1]. Complementary investigations also described that açai contains important bioactive molecules including  $\alpha$ -tocopherol, anthocyanins (cyanidin 3-glycoside and cyanidin 3-rutinoside), and other flavonoids [2]. The açai’s chemical matrix could explain the several biological propertiers of this fruit including antioxidant, genoprotective and anti-inflammatory effects [3, 4]. Machado et al [5] also suggested that açai could protect and revert mitochondrial dysfunctions in neural cells. Moreover, previous *in vivo* experiments described that açai presents antiaterosclerotic effect by improving HDL-cholesterol metabolism and regulation of hepatic lipogenesis and cholesterol excretion [6-9].

From these results is plausible to infer that açai supplements could be helpful in the control of some chronic non-transmissible diseases, and this hypothesis was previously tested from several studies [1, 10-16]. Therefore, it is possible that açai supplementation could also attenuate some negative side effects triggered by pharmacological drugs such as antipsychotics. This is the case of olanzapine (OLZ), an atypical antipsychotic drug of the thienobenzodiazepine class, that blocks multiple neurotransmitter receptors, including the D2 and 5-HT2 receptors. This drug have been used for the treatment of resistant and no-resistant schizophrenia including children and adolescents [17, 18], in the therapeutic maintenance of bipolar disorder [19], to manage agitation in adults with progressive dementia [20] and in the treatment of Huntington's Disease [21]. Moreover, OLZ has been used to attenuate chemotherapy-induced nausea and vomiting, including children less than 13 years [22]. However, OLZ has side effects triggering metabolic alterations including increase in body mass index (IMC), visceral fat, myotonia and diabetes *mellitus* type 2 [23,24]. These side effects

seems to be associated with peripheral and adipocyte tissue chronic oxi-inflammatory states triggered by OLZ administration [25].

In this context, we hypothesized that açai supplement obtained by a hydro-alcoholic extraction, that has low levels of fat and glucose molecules could present potential therapeutic action on inflammatory state triggered by OLZ-exposure. To test this hypothesis was conducted here an *in vitro* studies using the commercial RAW 264.7 macrophage cell line exposed to OLZ and açai extract.

## **Material and Methods**

### **Chemicals and equipments**

All chemicals and reagents used in this study were of analytical grade purchased from Merck (Darmstadt, Germany) or Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA). Plastics and reagents used for cell culture procedures were acquired from Gibco™ (Thermo Fisher Scientific; Grand Island, NY, USA). Molecular biology reagents were purchased from: TRIzol reagent (Thermo Fisher Scientific; Grand Island, NY, USA), iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad Laboratories; Hercules, CA, USA), DNase (Invitrogen Life Technologies; Carlsbad, CA, USA), QuantiFast SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Spectrophotometric and fluorimetric analysis were performed in a SpectraMax® i3x Multi-Mode Microplate Reader; Molecular Devices, (Sunnyvale, CA, USA) equipment.

### **General experimental design**

An *in vitro* protocol was performed using a commercial RAW 264.7 macrophage cell line (ATCC® TIB-71™) obtained from the American Type Culture Collection (ATCC®, Manassas, VA, USA) cultured under standardized conditions. Cells were cultured using *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) with 10% fetal bovine serum (FBS),

supplemented with 1% penicillin/streptomycin and 1% anfotericine B antifungal. Cell cultures were maintained at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> and expanded to obtain the optimal amount for the experiments.

General protocols used here were similar to previously described by Barbisan [26] and Fernandes [27] involving *in vitro* psychotropic drugs analysis on macrophage inflammatory response. As macrophages are highly sensitive to antigens and other antigenic factors, in the presence of these molecules an intense cellular proliferation and morphological changes occurs. These alterations, especially cellular proliferation in 72 h cell cultures, can be used as marker of inflammatory activation of immune cells. OLZ plasma therapeutic values are preconized in guidelines for therapeutic drug monitoring in neuropsychopharmacology [28]. The therapeutic concentration of OLZ used here was 0.03 µg / mL, chosen for triggering inflammatory and oxidative response, as previously described by Fernandes [27]. Phytohemagglutinin (PHA) antigen (125 µg/mL) was used as positive inflammatory control group.

Macrophages were concomitantly exposed to the pro-inflammatory OLZ concentration plus açaí extract at different concentrations (0.01, 0.05, 0.1, 1, 5, and 10 µg/mL). The chosen of açaí concentration was based in previous study performed by Machado et al (2016). The potential anti-inflammatory effect of açaí on inflammatory response triggered by OLZ was also evaluated by cellular proliferation and complementary tests involving modulation of oxidative, inflammatory and apoptotic biomarkers at protein and gene level. All protocols were triplicated from independent experiments.

### **Açaí extract preparation and chemical characterization**

The present investigation is part of a project previously approved by the Brazilian Environmental Ministry to access the components of the genetic patrimony in national territory (no. 010547/2013-4) according to the Brazilian Legislation (no. 2186-16). Açaí hydroalcoholic

extract with low fat-acids concentrations used in the experiments were previously prepared and chemically characterized by Machado et al [5]. In brief, açai fruits were obtained from Manaus city (Amazonas state) and a hydro alcoholic extract from skin and pulp fractions was prepared (21 days extraction in 70% absolute ethanol: 30% distilled water, v:v; at a concentration of 300 mg/mL). Further, the açai extract was lyophilized and main bioactive molecules were quantified by high performance liquid chromatography (HPLC-DAD) using a Shimadzu Prominence Auto Sampler (SIL-20A) system (Shimadzu, Kyoto, Japan) equipment. Main compounds identified and quantified in the açai hydro alcoholic extract were (mg/g): orientin ( $8.05 \pm 0.03$ ), *p*-coumaric acid ( $3.52 \pm 0.01$ ), apigenin ( $3.29 \pm 0.01$ ), cyanidin-3-*O*-glucoside ( $2.62 \pm 0.01$ ), luteolin ( $2.57 \pm 0.02$ ), epicatechin ( $2.37 \pm 0.02$ ), vitexin ( $2.19 \pm 0.01$ ) and chrysin ( $1.83 \pm 0.01$ ). Moreover, gallic, chlorogenic, caffeic acids and catechin were also detected and quantified ( $<1$  mg/g) [5].

### **Cell proliferation analysis**

Macrophage cellular proliferation in 72 h cell cultures indicates pro-inflammatory response [26]. Therefore, a preliminary analysis of pro-inflammatory OLZ effect and reversion by açai supplementation in macrophage cells was determined by cell proliferation analysis by de MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) tetrazolium method. This is a reduction assay was evaluated using macrophage cultures using a protocol modified from Mosmann [29]. Briefly, cells were seeded in 96-well plates at a final concentration of  $2 \times 10^5$  cells/mL and MTT reagent was added to the cells at a final concentration of 0.5 mg/mL. After 1h of incubation at 37°C, formazan crystals were solubilized using dimethylsulfoxide (DMSO) and absorbance was recorded at 560 nm wavelength using a plate reading spectrophotometer (SpectraMax® i3x Multi-Mode Microplate Reader; Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

### **ROS and NO levels assessment**

The inflammatory response of macrophages is directly associated with increase of some oxidative molecules especially nitric oxide (NO) [26, 30]. For this reason, levels of reactive oxygen species (ROS) and NO were quantified in macrophages exposed to OLZ and açaí. Oxidative stress was assessed after 72h by measuring total levels of reactive oxygen species (ROS) in RAW 264.7 cells using the 2,7 dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) assay. DCFH-DA is a nonfluorescent chemical that is deacetylated by mitochondrial esterase enzymes to DCFH which reacts with ROS and becomes DCF, a fluorescent molecule. Fluorescence was recorded at an excitation wavelength of 488 nm and an emission wavelength of 525 nm [31, 32]. NO levels measurement was determined after 72h following the Griess modified method [30]. In short, RAW 264.7 cells were incubated at room temperature with the Griess reagent for 10 min and the absorbance was recorded at 550 nm wavelength.

### **Cytokines and caspases immunoassays**

The modulation of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines by macrophages exposed to OLZ and açaí was also determined using similar method described by Barbisan et al. [26]. Furthermore, caspases (CASP) apoptotic caspase markers were also evaluated among these treatments. Both, cytokine and apoptic markers were quantified using immunological assays as described previously [26, 30]. Briefly, supernatants culture medium were used as sample to quantify the levels of CASP-8, CASP-3, and CASP-1 and cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , and IL-10 markers were quantified using Quantikine Human Caspase Immunoassay according to the manufacturer's instructions. Briefly, all reagents and working standards were prepared and the excess microplate strips were removed, before adding 50  $\mu$ L of the assay diluent RD1W to each well. Further, 100  $\mu$ L of standard control for our sample was added per well, after which the well was covered with an adhesive strip and incubated for

1.5 h at room temperature. Each well was subsequently aspirated and washed twice, for a total of three washes. The antiserum of each molecule analyzed here was added into wells and the plate was covered with a new adhesive strip, and subsequently incubated for 30 min at room temperature. Further, the aspiration/wash step was repeated, and the CASP-1 conjugate (100  $\mu\text{L}$ ) was added to each well and incubated for 30 min at room temperature. The aspiration/wash step was repeated before adding 100  $\mu\text{L}$  of substrate solution to each well, followed by incubation at room temperature for additional 20 min. The last step was performed by addition of 50  $\mu\text{L}$  of stop solution in each well. Optical density was determined within 30 min using a microplate reader set to 450 nm.

### **Statistical analyses**

The results obtained from all *in vitro* protocols were analyzed using *GraphPad Prism 6* statistical package software. All experiments were performed in independent triplicates and all protocols performed here and data treatment are according in vitro good practices presumptions [33]. In these terms, before statistical analysis most data were normalized and transformed as % of control. This type of standardization is currently used in many assays in cell biology, pharmacology and toxicology where generate data in which a parameter is measured in a reference system (negative control) and then also under conditions of increasing stress or drug exposure as previously described by Schoot et al [34]. Briefly, data were presented as % mean  $\pm$  standard deviation (SD) of negative or positive control group. Treatments were repeated, at least 5-times in each 96-well plate. The upper and lower values of 2-SD range found in these repetitions were considered outliers and excluded of the analysis. Data were compared statistically compared by One-way or Two-way analysis of variance followed by Tukey's *post hoc* tests. The p value was set at 0.05 to indicate statistical significance.

## Results

From these results was possible to evaluate the potential anti-inflammatory açai effects on macrophages previously exposed to OLZ antipsychotic drug (Figure 3). In this analysis, non-activated macrophages just açai-extract exposed at different concentrations (0.01 - 10  $\mu\text{g/mL}$ ), did not present alteration in cellular proliferation when compared to no-treated control cells. All açai-extract concentrations were able to prevent increase of cellular proliferation triggered by OLZ-exposure.

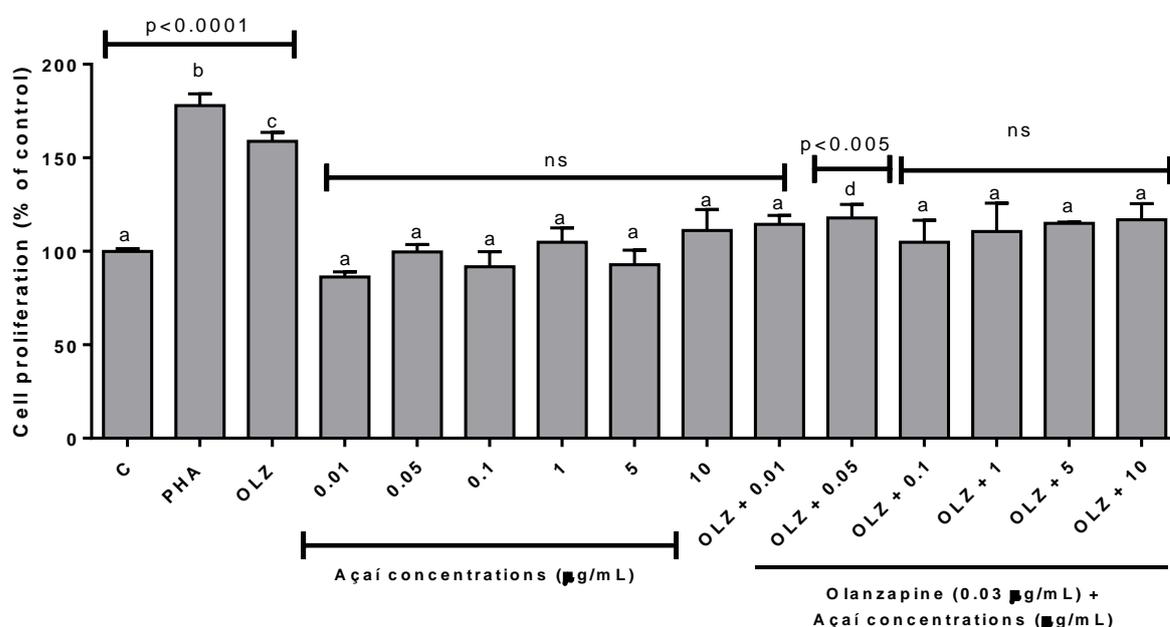


Figure 1- Cell proliferation of OLZ (0.03  $\mu\text{g/mL}$ ), açai concentration-effect curve (0.01, 0.05, 0.1, 1, 5, and 10  $\mu\text{g/mL}$ ) and associations was assessed in macrophages after 72 h by MTT assay. Data are presented as percentage of the untreated control group (negative control). PHA (125  $\mu\text{g/mL}$ ) was used as a positive inflammatory control. Statistical comparison was performed by one-way analysis of variance followed by Tukey's post hoc test. Different letters indicate significant differences. C=Negative control; PHA=phytohemagglutinin; OLZ=olanzapine.

Results from two oxidative markers analyzed showed that açai was able to decrease ROS levels just in  $\geq 1 \mu\text{g/mL}$  concentrations (Figure 2A). On the other hand, NO levels returned to similar concentrations observed in the control group when cells were exposed to OLZ and all açai-extract concentrations tested (Figure 2B).

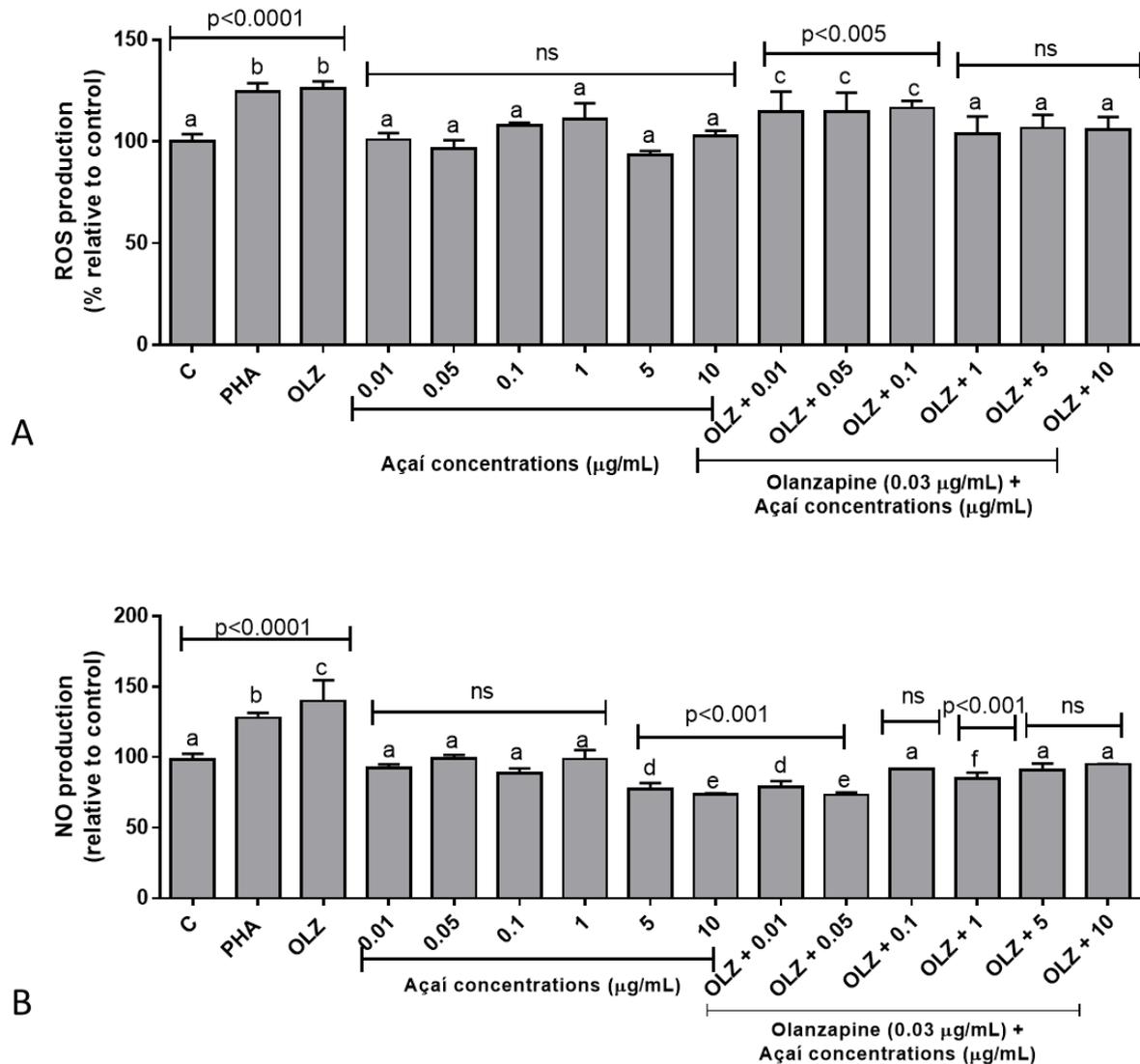


Figure 2- Oxidative Markers. ROS (A) and NO (B) production levels of OLZ (0.03  $\mu\text{g/mL}$ ), açai concentration-effect curve (0.01, 0.05, 0.1, 1, 5, and 10  $\mu\text{g/mL}$ ) and associations was assessed in macrophage cells after 72 h. Data were statistically compared by one-way analysis of variance followed by Tukey's post hoc test. Different letters indicate significant differences. Data are presented as percentage of the untreated control group (negative control). PHA (125

$\mu\text{g/mL}$ ) was used as a positive inflammatory control. C=Negative control; PHA=phytohemagglutinin; OLZ= olanzapine.

Based on the results obtained from the MTT assay and oxidative markers, açai concentration of 5  $\mu\text{g/mL}$  was chosen to perform additional analysis of inflammatory modulation markers including cytokines (figure 3), as well as caspases (Figure 4). In the presence of açai-extract at 5  $\mu\text{g/mL}$  IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  levels decreased significantly when compared to macrophages OLZ and PHA-exposed. However, this effect was partial, since açai-extract was not able to revert levels of these pro-inflammatory cytokines to similar values found in the non-activated control macrophages. Açai-extract was also able to increase partially the levels of IL-10, an antiinflammatory cytokines in cells concomitantly OLZ-exposed. Analysis of apoptotic markers showed that açai prevent significant the increase of CASP-1, 3 and 8 triggered by OLZ (figure 4).

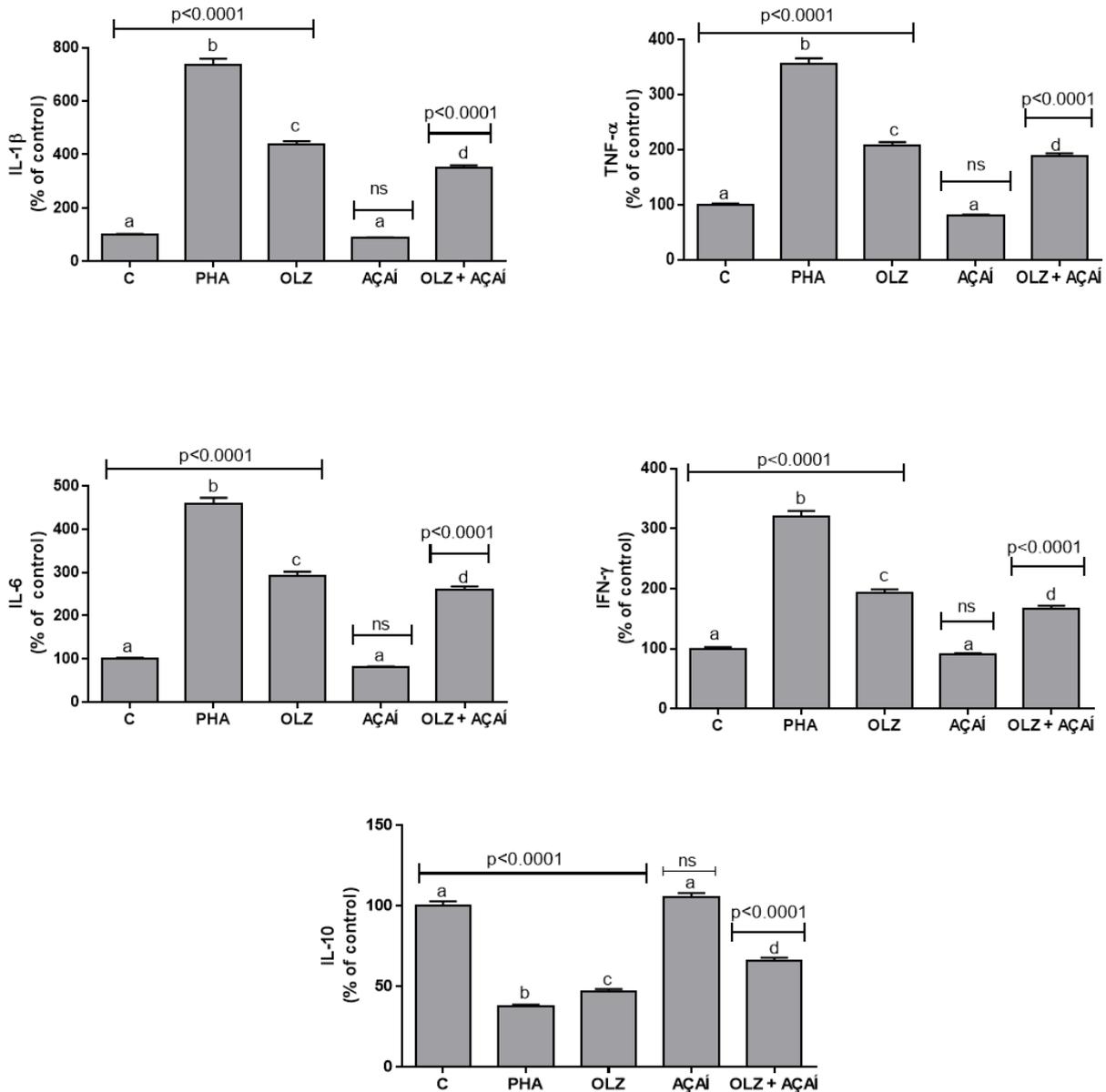


Figure 3- Effects of OLZ (0.03  $\mu\text{g/mL}$ ), açai (5  $\mu\text{g/mL}$ ) and associations on pro-inflammatory (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , and IFN- $\gamma$  cytokines and anti-inflammatory cytokine (IL-10, E) levels measured by immunoassay in 72h cell cultures. Data are presented as percentage of the untreated control group (negative control). Data were statistically compared by one-way analysis of variance followed by Tukey's post hoc test. Different letters indicate significant differences. PHA (125  $\mu\text{g/mL}$ ) was used as a positive inflammatory control. Different letters indicate significant differences. C=Negative control; PHA=phytohemagglutinin; OLZ=olanzapine.

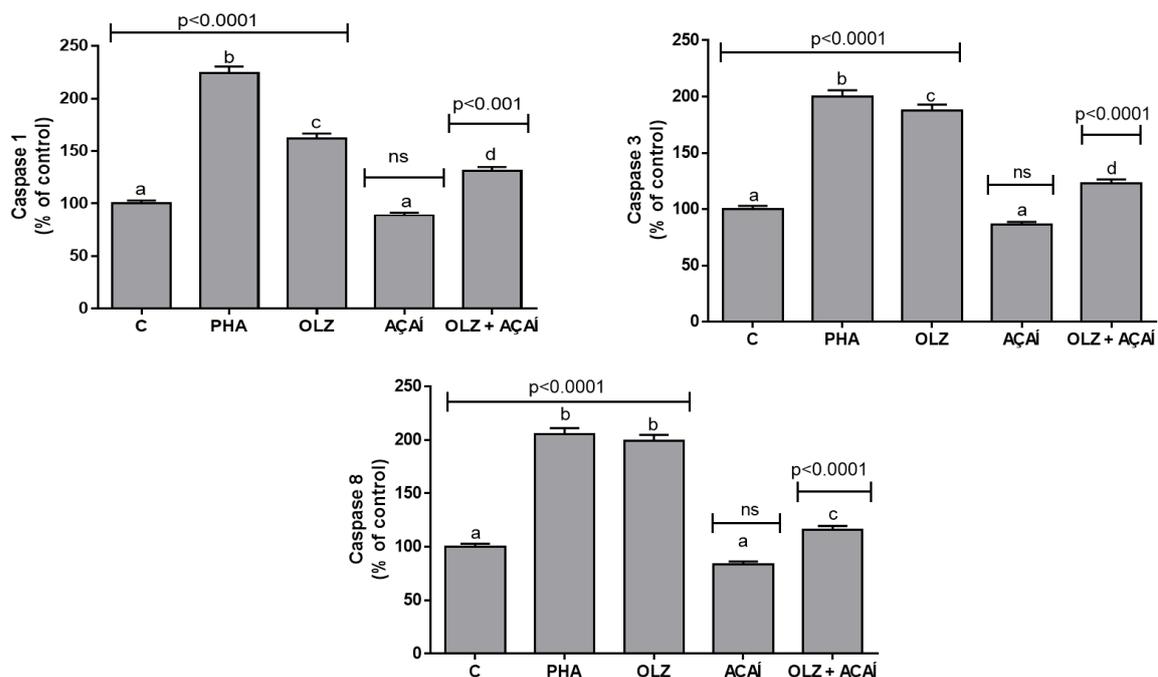


Figure 4- Effects of OLZ (0.03 µg/mL), açai (5 µg/mL) and associations on caspases levels measured by immunoassay. Data are presented as percentage of PHA (125 µg/mL) was used as a positive inflammatory control. Different letters indicate significant differences. C=Negative control; PHA=phytohemagglutinin; OLZ= olanzapine.

## Discussion

The present study evaluated *in vitro* açai-extract effect on pro-inflammatory response triggered by macrophage-exposure to OLZ. The results suggested that açai reverted, at least partially, inflammatory states caused by OLZ suggesting that supplements based in extracts of this fruit richest in anti-inflammatory molecules could be a potential strategy to minimize side effects triggered by this antipsychotic drug. This assumption is based in the açai differential effect on cellular proliferation, cytokine modulation, and oxidative stress indicators induced by OLZ.

From these general results it is important to perform some theoretical and methodological considerations. OLZ is used, among other first and second generation antipsychotics, as a therapeutic approach for the treatment of schizophrenic-related symptoms.

However, some studies have shown that patients under chronic use of antipsychotic drugs, mainly second generation, have a tendency to present metabolic alterations, risk of obesity and cardiovascular disease [35]. In this sense, some research suggested that chronic inflammatory processes may be involved in the mechanisms which trigger obesity, with the contribution of macrophages and inflammatory cytokines [36,37]. It has been speculated whether inflammatory mechanisms may be participating in the increased risks of weight gain and subsequently of obesity resultant from the use of atypical antipsychotics [25,38].

In consequence of this process, studies performed in different experimental models have indicated that OLZ triggered a generalized macrophage-infiltration in the adipocyte tissue, increasing the protein and gene expression of pro-inflammatory cytokines and ROS production [25, 38]. Therefore, the use of RAW macrophage as experimental model to test anti-inflammatory effect of açai-extract is justified. Previous investigations described that these macrophages can be activated by natural such as PHA and other pro-inflammatory molecules. The activation induce increase in some oxidative molecules and pro-inflammatory cytokines, such as IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF [24,26,30,39]. Therefore, OLZ at 0.03  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , that is into plasmatic therapeutic variation of this drug was considered a pro-inflammatory concentration [27] and subsequently used in complementary protocols performed here.

Another important OLZ-effects is respect to induction of apoptosis markers in macrophage cells. This result could be considered or an immunosuppression or a cytotoxic effect of this antipsychotic drug. Considering that levels of proinflammatory cytokines were increased is possible to infer that OLZ could trigger increase of macrophage mortality by apoptosis induction. This presumption is also based in previous investigations that reported OLZ apoptotic effect on hamster pancreatic  $\beta$  cell line, that produces insulin. Authors considered that given clinical observations of patients OLZ-treated exhibit hyperlipidemia and hyperglycemia without gaining weight, these results suggest that this antipsychotic drug could

triggered some damages to pancreatic  $\beta$  cells may contribute to the undesirable metabolic consequences of OLZ treatment in some cases. However, the main cause of apoptosis induction by OLZ remains to be clarified since previous investigations did not find relevant genotoxic effect triggered by this drug [40, 41].

This general inflammatory framework triggered by OLZ on macrophages was partially reverted when cells were açai-exposed as synthesized in the Figure 5. The initial results showed that all concentrations of açai-extract were able to reduce cellular proliferation to levels similar of control cells. Complementary analysis confirmed that açai-extract presented, at partially attenuated pro-inflammatory effect of macrophages OLZ-induced. It is possible that elevate açai concentrations could increment this action. The capacity of açai to modulate oxidative-inflammatory response of macrophages OLZ-exposed is according to literature [5, 41, 43].

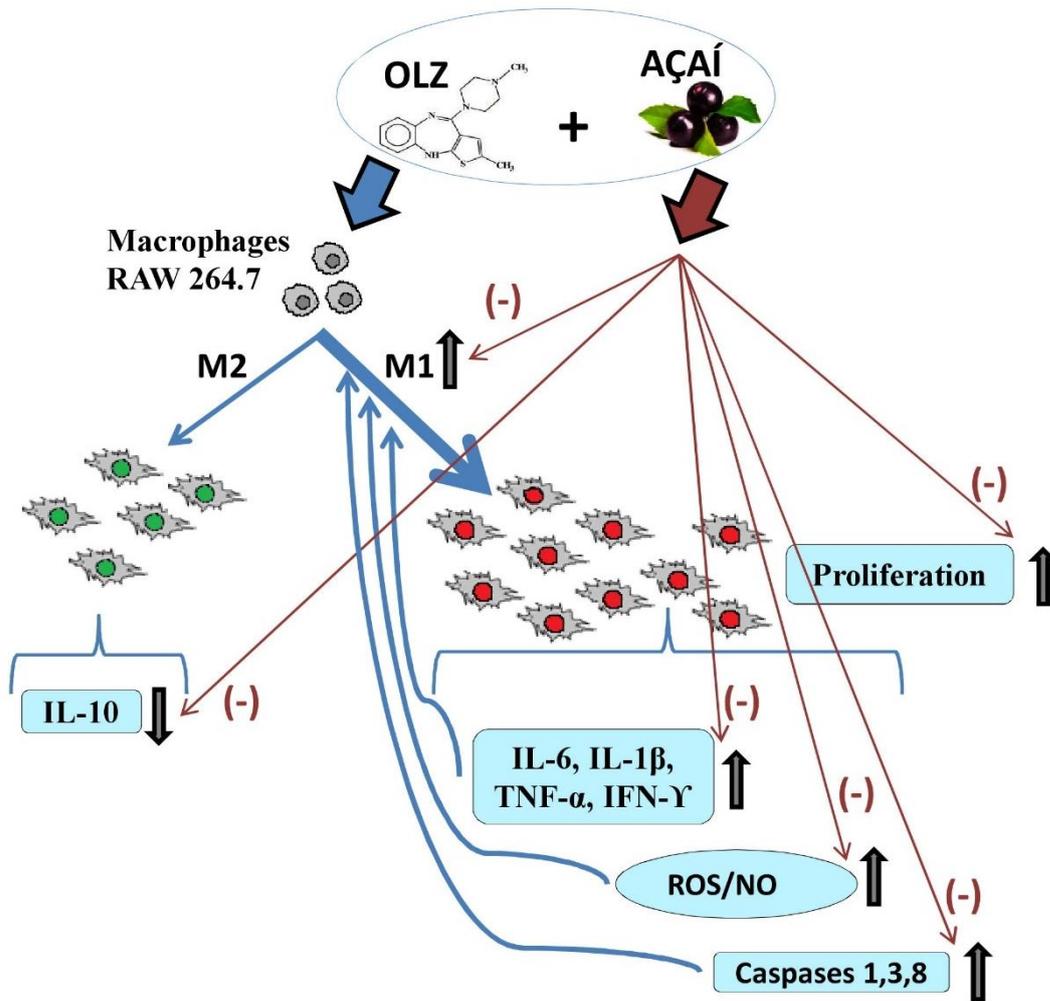


Figure 5- Synthesis of main effects of açaí hydro-alcoholic extract (5  $\mu\text{g/mL}$ ) on RAW macrophages cells activated by olanzapine (OLZ), an antipsychotic drug at 0.03  $\mu\text{g/mL}$  concentration. Açaí-extract was able to reduce partially oxidative, apoptotic and inflammatory markers that are increased in macrophage just OLZ-exposed. M1= classical via; M2= alternative via of inflammatory response. IL-1 $\beta$ = Interleukin 1 $\beta$ . IL-6=Interleukin 6. TNF- $\alpha$ = Tumor Necrosis Factor alpha IFN- $\gamma$ = Interferon gamma. IL-10= Interleukin 10. ROS=Reactive Oxygen Species. NO= Nitric Oxide. Brown arrows with (-) = indicate the effect of açaí attenuation on oxy-inflammatory markers of cells exposed to OLZ.

Moreover, the wole of results could indicate possible subjacent mechanisms involving regulation of classic and alternative inflammatory pathways. In fact, macrophages present a

dynamic ability to change its characteristics in response to microenvironment signalization. In this way, these cells can be activated becoming M1 macrophages that express several pro-inflammatory cytokines, and also can be turn M2 macrophages, that express anti-inflammatory cytokines. In M2-phenotype macrophages inhibit pro-inflammatory production and trigger tissue regenerative responses. of ted form [41,42,43]. Açai seems act in the two macrophage phenotypes, considering that its supplement decreased pro-inflammatory cytokine and increase IL-10 levels, that is an anti-inflammatory marker. These results corroborate previous investigations that described, for example that açai was able to inhibits osteoclast differentiation and activity, that are processes directly associated to inflammatory states [44]. Studies performed in animal models, also described that açai pulp was able to improve cognition in aged-rats and attenuates inflammatory signalling in BV-2 microglial cells [45].

The açai-extract anti-inflammatory effects on macrophage OLZ-exposed is possibly consequence of bioactive molecules present in its chemical matrix [3,43]. Specially açai-extract obtained and use in our experiments has several polyphenols, such as orientin, p-coumaric acid, apigenin, cyanidin-3-O-glucoside, luteolin, epicatechin, among others, as previously characterized by Machado et al [5]. Some of these isolated molecules have been already investigated for possessing key biological activities, for example: a) orientin presents considerable antioxidant, neuroprotective and anti-inflammatory activities [47,48]; b) p-coumaric acid has important antioxidant properties [49]; c) apigenin exerts antioxidant and neuroprotective effects [50]. It is possible that these molecules and other açai chemical matrix minor constituents, besides acting by their antioxidant and anti-inflammatory activities, reducing ROS, NO and pro-inflammatory indicators levels may be modulating other pathways as observed here. In fact, açai was able to reduce the expression of caspases 3 and 8, consequently decreasing the proapoptotic signaling pathway triggered by OLZ.

Finally, it is important to point out methodological constraints related with the study presented here. This is an *in vitro* investigation, and for this reason the whole of results must to be considered with prudence, as *in vivo* systems are more complex and can attenuated or amplify the results described here related to potential anti-inflammatory effect of açai on OLZ [33]. However, to minimize this main limitation, we conducted our protocol with RAW 264.7 cells culture considering the large number of studies that also used this *in vitro* model to test potential anti-inflammatory effect of foods, phytotherapics and isolated chemical molecules. Furthermore, it is relevant to comment that early identification of natural food supplements, which could attenuate metabolic side effects triggered by OLZ is difficult to do using *in vivo* animal models or in humans. This is because, for testing a large amount of açai concentrations, a large number of animals, like rats and mice would also be required becoming the experiments very expensive, long-term and ethically unacceptable. On the other hand, direct human clinical assays are difficult to perform since, in general, patients who use OLZ are polymedicated and may present several comorbidities. For this reason, the use of *in vitro* exploratory approach could be considered a methodological strategy that is relatively easy to carry out reducing the amount of bias associated with investigations in humans.

Therefore, despite these methodological concerns related to *in vitro* investigations our results suggest that açai-extract could present therapeutical anti-inflammatory action on OLZ side-effects triggered in macrophage cells.

## **Conclusion**

In summary, the whole of results described here suggest that açai-extract could be useful to attenuate peripheral inflammatory states triggering by use of OLZ for patients' carriers of neuropsychiatric diseases, such as schizophrenia, bipolar disorder and dementia. From these

results could be useful additional investigations associated to development of therapeutic açai-extract supplements.

### **Funding**

The authors gratefully acknowledge “Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)” by Project number 400816/2016-4, “Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)” for financial support and “PROEX/CAPES” number 23038.005848/2018-31 for financial the reader equipment.

### **Compliance with ethical standards**

Conflict of interest: The authors declare that there is no conflict of interest.

Compliance with ethics requirements This article does not contain any studies with human or animal subjects.

### **References**

1. Rufino MSM, Alves RE, Brito ES, Pérez-Jiménez J, Saura-Calixto F, Mancini-Filho J (2010) Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 nontraditional tropical fruits from Brazil. *Food Chem* 121: 996-1002
2. Ulbricht C, Brigham A, Burke D, Costa D, Giese N, Iovin R, Grimes Serrano JM, Tanguay-Colucci S, Weissner W, Windsor R (2012) An evidence-based systematic review of acai (*Euterpe oleracea*) by the Natural Standard Research Collaboration. *J Diet Suppl* 9:128-147

3. Yamaguchi KK, Pereira LF, Lamarão CV, Lima ES, da Veiga-Junior VF (2015) Amazon açai: chemistry and biological activities: a review. *Food Chem* 179:137-151
4. Favacho HAS, Oliveira BR, Santos KC et al(2011) Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Euterpe oleracea* oil. *Brazilian J Pharmacogn* 21:105–114
5. Machado AK, Andreazza AC, da Silva TM, et al (2016) Neuroprotective Effects of açai (*Euterpe oleracea* Mart.) against Rotenone *In Vitro* Exposure. *Oxid Med Cell Longev* 2016:8940850
6. Feio CA, Izar MC, Ihara SS, et al (2012) *Euterpe Oleracea* (Açai) Modifies Sterol Metabolism and Attenuates Experimentally-Induced Atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb* 19:237–245
7. De Oliveira PRB, Da Costa CA, De Bem GF, et al (2015) *Euterpe oleracea* Mart.-derived polyphenols protect mice from diet-induced obesity and fatty liver by regulating hepatic lipogenesis and cholesterol excretion. *PLoS One* 10:1–16
8. Sadowska-Krępa E, Kłapcińska B, Podgórski T, et al (2015) Effects of supplementation with açai (*Euterpe oleracea* Mart.) berry-based juice blend on the blood antioxidant defence capacity and lipid profile in junior hurdlers. A pilot study. *Biol Sport* 32:161–168
9. Pala D, Barbosa PO, Silva CT, et al (2017) Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) dietary intake affects plasma lipids, apolipoproteins, cholesteryl ester transfer to high-density lipoprotein and redox metabolism: A prospective study in women. *Clin Nutr* 1–6

10. Martins ICVS, Borges NA, Stenvinkel P, Lindholm B, Rogez H, Pinheiro MCN, Nascimento JLM, Mafra D (2018) *Int Urol Nephrol*
11. Zhou J, Zhang J, Wang C, Qu S, Zhu Y, Yang Z, Wang L (2018) Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) attenuates alcohol-induced liver injury in rats by alleviating oxidative stress and inflammatory response. *Exp Ther Med* 15:166-172
12. Monge-Fuentes V, Muehlmann LA, Longo JP, Silva JR, Fascineli ML, de Souza P, Faria F, Degterev IA, Rodriguez A, Carneiro FP, Lucci CM, Escobar P, Amorim RF, Azevedo RB (2017) Photodynamic therapy mediated by açai oil (*Euterpe oleracea* Martius) in nanoemulsion: A potential treatment for melanoma. *J Photochem Photobiol B* 166:301-310
13. Alqurashi RM, Galante LA, Rowland IR, Spencer JP, Commane DM (2016) Consumption of a flavonoid-rich açai meal is associated with acute improvements in vascular function and a reduction in total oxidative status in healthy overweight men. *Am J Clin Nutr* 104:1227-1235
14. Nascimento VH, Lima CD, Paixão JT, Freitas JJ, Kietzer KS (2016) Antioxidant effects of açai seed (*Euterpe oleracea*) in anorexia-cachexia syndrome induced by Walker-256 tumor. *Acta Cir Bras* 31:597-601
15. Sudo RT, Neto ML, Monteiro CE, Amaral RV, Resende ÂC, Souza PJ, Zapata-Sudo G, Moura RS (2015) *Antinociceptive effects of hydroalcoholic extract from Euterpe oleracea* Mart. (Açai) in a rodent model of acute and neuropathic pain. *BMC Complement Altern Med* 15:208

16. da Costa CA, de Oliveira PR, de Bem GF, de Cavalho LC, Ognibene DT, da Silva AF, Dos Santos Valença S, Pires KM, da Cunha Sousa PJ, de Moura RS, Resende AC (2012) *Euterpe oleracea* Mart.-derived polyphenols prevent endothelial dysfunction and vascular structural changes in renovascular hypertensive rats: role of oxidative stress. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 385:1199-1209
17. Komossa K, Rummel-Kluge C, Hunger H, et al (2010) Olanzapine versus other atypical antipsychotics for schizophrenia. *Cochrane database Syst Rev* CD006654
18. Krause M, Zhu Y, Huhn M, et al (2018) Efficacy, acceptability, and tolerability of antipsychotics in children and adolescents with schizophrenia: A network meta-analysis. *Eur Neuropsychopharmacol* 28:659–674
19. Lindström L, Lindström E, Nilsson M, Höistad M (2017) Maintenance therapy with second generation antipsychotics for bipolar disorder – A systematic review and meta-analysis. *J Affect Disord* 213:138–150
20. Farlow MR, Shamlivan TA (2017) Benefits and harms of atypical antipsychotics for agitation in adults with dementia. *Eur Neuropsychopharmacol* 27:217–231
21. Dale M, van Duijn E (2015) Anxiety in Huntington's Disease. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 27:262–271

22. Yoodee J, Permsuwan U, Nimworapan M (2017) Efficacy and safety of olanzapine for the prevention of chemotherapy-induced nausea and vomiting: A systematic review and meta-analysis. *Crit Rev Oncol Hematol* 112:113–125
  
23. Xia L, Li W-Z, Liu H-Z, et al (2018) Olanzapine Versus Risperidone in Children and Adolescents with Psychosis: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *J Child Adolesc Psychopharmacol* XX:cap.2017.0120
  
24. Zhang F, Li F, Chen G (2014) Neuroprotective effect of apigenin in rats after contusive spinal cord injury. *Neurol Sci* 35:583–588
  
25. Sárvári AK, Veréb Z, Uray IP, et al (2014) Atypical antipsychotics induce both proinflammatory and adipogenic gene expression in human adipocytes *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun* 450:1383–1389
  
26. Barbisan F, Azzolin VF, Teixeira CF, et al (2017) Xanthine-catechin mixture enhances lithium-induced anti-inflammatory response in activated macrophages *in vitro*. *Biomed Res Int* article ID 4151594
  
27. Fernandes MS, Barbisan F, Azzolin VF, et al (2019) Lithium is able to minimize olanzapine oxidative-inflammatory induction on macrophage cells. *PLoS ONE* 14: e0209223

28. Schoretsanitis G, Paulzen M, Unterecker S, et al (2018) TDM in psychiatry and neurology: A comprehensive summary of the consensus guidelines for therapeutic drug monitoring in neuropsychopharmacology, update 2017; a tool for clinicians. *World J Biol Psychiatry* 19:162–174
29. Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55–63
30. Da Cruz Jung IE, Machado AK, Da Cruz IBM, et al (2016) Haloperidol and Risperidone at high concentrations activate an *in vitro* inflammatory response of RAW 264.7 macrophage cells by induction of apoptosis and modification of cytokine levels. *Psychopharmacology (Berl)* 233:1715–1723
31. Azzolin VF, Cadoná FC, Machado AK, et al (2016) Superoxide-hydrogen peroxide imbalance interferes with colorectal cancer cells viability, proliferation and oxaliplatin response. *Toxicol Vitro* 32:8-15
32. Costa F, Barbisan F, Assmann CE, et al (2017) Seminal cell-free DNA levels measured by PicoGreen fluorochrome are associated with sperm fertility criteria. *Zygote* 25:111–119
33. Griesinger C, Desprez B, Coecke S, Casey W, Zuang V (2016) Validation of Alternative *In Vitro* Methods to Animal Testing: Concepts, Challenges, Processes and Tools. *Adv. Exp. Med. Biol* 132, 856-865

34. Schott K L, Assmann CE, Teixeira CF, Boligon A A, Waechter SR, Duarte MMF, da Cruz IBM (2018). Brazil nut improves the oxidative metabolism of superoxide-hydrogen peroxide chemically-imbalanced human fibroblasts in a nutrigenomic manner. *Food Chem Toxicol* 121:519-526
35. Rojo LE, Gaspar PA, Silva H, et al (2015) Metabolic syndrome and obesity among users of second generation antipsychotics: A global challenge for modern psychopharmacology. *Pharmacol Res* 101:74–85
36. Cildir G, Akincilar SC, Tergaonkar V (2013) Chronic adipose tissue inflammation: All immune cells on the stage. *Trends Mol Med* 19:487–500
37. Weisberg SP, McCann D, Desai M, et al (2003) Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 112:1796–1808
38. Victoriano M, De Beaupaire R, Naour N, et al (2010) Olanzapine-induced accumulation of adipose tissue is associated with an inflammatory state. *Brain Res* 1350:167–175
39. Del-Ángel M, Nieto A, Ramírez-Apan T, Delgado G (2015) Anti-inflammatory effect of natural and semi-synthetic phthalides. *Eur J Pharmacol* 752:40–48
40. Türkez H, Toğar B (2010) The genotoxic and oxidative damage potential of olanzapine *in vitro*. *Toxicol Ind Health* 26:583-588

41. Togar B, Turkez H, Tatar A, Kirkpinar I, Hacimuftuoglu A, Geyikoglu F, Keles MS, Dirican E (2012) The genotoxic potentials of some atypical antipsychotic drugs on human lymphocytes. *Toxicol Ind Health* 28:327-333
42. Rogez H, Pompeu DR, Akwie SNT, Larondelle Y (2011). Sigmoidal kinetics of anthocyanin accumulation during fruit ripening: A comparison between açai fruits (*Euterpe oleracea*) and other anthocyanin-rich fruits. *J Food Compos Anal* 24:796-800
43. Ulbricht C, Brigham A, Burke D, et al (2012) An evidence-based systematic review of açai (*Euterpe oleracea*) by the natural standard research collaboration. *J Diet Suppl* 9:128–147
44. Odegaard JI, Chawla A (2011) Alternative Macrophage Activation and Metabolism. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 6:275–297
45. Brüne B, Dehne N, Grossmann N, et al (2013) Redox Control of Inflammation in Macrophages. *Antioxid Redox Signal* 19:595–637
46. Lackey DE, Olefsky JM (2016) Regulation of metabolism by the innate immune system. *Nat Rev Endocrinol* 12:15–20
47. Yoo H (2014) Orientin inhibits HMGB1-induced inflammatory responses in HUVECs and in murine polymicrobial sepsis. *Inflammation* 37:1705–17

48. Tian T (2018) Neuroprotective effects of orientin on oxygen-glucose deprivation/reperfusion-induced cell injury in primary culture of rat cortical neurons. *Exp Biol Med* 243:78–86
49. Chacko SM, Nevin KG, Dhanyakrishnan R, Kumar BP (2015) Protective effect of p-coumaric acid against doxorubicin induced toxicity in H9c2 cardiomyoblast cell lines. *Toxicol Reports* 2:1213–1221
50. Nabavi SF, Khan H, D'onofrio G, et al (2018) Apigenin as neuroprotective agent: Of mice and men. *Pharmacol Res* 128:359-365



## 6 DISCUSSÃO

A presente investigação buscou avaliar, *in vitro*, uma potencial ação moduladora anti-inflamatória e antioxidante, do lítio ou do extrato hidroalcoólico do açaí, na resposta oxidativa-inflamatória da OLZ. Para tanto foi utilizado como modelo experimental macrófagos RAW 264.7 de origem murina. O conjunto dos resultados mostrou que, o lítio e o açaí foram capazes de reverter, pelo menos parcialmente, o perfil pró-inflamatório causado pela OLZ. Esses resultados sugeriram que o tratamento concomitante ou com fármacos como o lítio, ou com suplementos nutricionais como o açaí poderiam ser uma estratégia importante para minimizar os efeitos adversos periféricos, decorrentes da monoterapia com OLZ. Essa suposição baseia-se nos efeitos diferenciais apresentados pelo lítio e pelo açaí em relação a proliferação celular, modulação de citocinas e indicadores de estresse oxidativo, causados pela OLZ.

A partir desses resultados é preciso realizar algumas considerações teóricas e metodológicas sobre os mesmos. A OLZ é usada, assim como outros ASGs e APGs, como uma abordagem terapêutica para o tratamento de sintomas relacionados a esquizofrenia. No entanto, alguns estudos indicam que pacientes em uso crônico de fármacos antipsicóticos, principalmente ASG, tendem a apresentar, como efeito adverso alterações metabólicas, risco de obesidade e problemas cardiovasculares (ROJO et al., 2015). Nesse sentido, alguns trabalhos sugerem que esses efeitos adversos provocados pela OLZ são decorrentes de um processo inflamatório, de baixo nível e crônico, que ocorre de forma semelhante a mecanismos inflamatórios envolvidos na obesidade e síndrome metabólica (SÁRVÁRI et al., 2014; VICTORIANO et al., 2010). Como consequência desse processo, os estudos em diferentes modelos indicam que a OLZ desencadeia uma infiltração generalizada de macrófagos para o tecido adiposo, aumento da expressão de diversas citocinas pró-inflamatórias e aumento da produção de EROs (SÁRVÁRI et al., 2014; VICTORIANO et al., 2010).

Nesse contexto, o modelo metodológico escolhido envolveu a utilização da linhagem celular comercial de macrófagos RAW 264.7 para avaliar a resposta inflamatória da OLZ e a possível modulação dessa resposta pelo lítio ou pelo açaí. Nesse modelo, para controle positivo, os macrófagos podem ser ativados por antígenos como a fitohemaglutinina (PHA), levando a produção de mediadores inflamatórios como IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e EROs (BARBISAN et al., 2017; DA CRUZ JUNG et al., 2016; DEL-ÁNGEL et al., 2015).

Para os estudos iniciais com a OLZ, foi escolhida uma ampla faixa de concentração do fármaco. Ressalta-se a importância da faixa de concentração escolhida, pelo fato da literatura apresentar estudos com OLZ *in vitro*, com variações de concentrações de poucos nanogramas

por mL até concentrações mais elevadas, na faixa de microgramas por mL. Além disso, existem muitos estudos com diferentes linhagens celulares, mas nenhum estudo, até o momento, com linhagens de macrófagos RAW 264.7 avaliando o perfil pró-inflamatório da OLZ (GONÇALVES; ARAÚJO; MARTEL, 2015; SÁRVÁRI et al., 2014; SCAINI et al., 2018; VESTRI et al., 2007; VUCICEVIC et al., 2014).

A curva de concentração da OLZ é apresentada nos artigos 1 e 2, indicando um efeito hormético. Em baixas concentrações houve um aumento da proliferação celular (confirmada pela análise do ciclo celular e alteração morfológica, típica da ativação dos macrófagos). No entanto, em concentrações mais altas, a partir de 1µg/mL, houve a redução gradativa da proliferação celular, indicando potencial efeito citotóxico ou imunossupressor de OLZ em células macrofágicas. De fato, estudos anteriores relataram a possível indução de apoptose pela OLZ em linhagem de células β pancreáticas de hamster. Essa ação poderia explicar o possível efeito pró-diabético associado à administração do OLZ (OZASA et al., 2013). Pessina et al. (2006) também descreveu o potencial efeito citotóxico da alta concentração de OLZ em macrófagos.

Segundo as diretrizes para o monitoramento terapêutico de drogas (MTD) (SCHORETSANITIS et al., 2018) e recente revisão de Mauri et al. (2018), a faixa de concentração plasmática terapêutica recomendada para a OLZ é de 0,02µg/mL a 0,08µg/mL. Dessa forma, os nossos resultados apresentaram um aumento da proliferação celular com concentrações da OLZ na faixa de 0,007µg/mL a 0,09µg/mL, semelhante a faixa terapêutica recomendada. Considerando a faixa terapêutica descrita, uma revisão sistemática mostrou que a concentração plasmática da OLZ tem ação terapêutica na faixa de 0,02µg/ml a 0,04µg/ml e, concentrações acima desse valor, não acarretariam benefícios terapêuticos adicionais significativos (BISHARA et al., 2013). Por esse motivo, no presente estudo, foi selecionada a concentração de 0,03µg/mL (30ng/mL) para posterior estudos de associação com lítio (artigo 1) ou açaí (artigo 2).

Esse efeito hormético da OLZ poderia explicar diferenças entre os resultados encontrados aqui e outros estudos publicados recentemente na literatura, como os realizados por Stapel et al. (2018). Esses autores mostraram que quando células mononucleares de sangue periférico (CMSPs) obtidas de adultos sadios foram expostas *in vitro* a OLZ na concentração de  $10^{-4}$  Molar, que corresponde a 31,24 µg/mL, ocorreram decréscimo nos níveis de RNAm (RNA mensageiro), ou seja na análise da expressão gênica, bem como dos níveis proteicos de IL-1β, IL-6 e TNF-α em relação ao grupo controle, em culturas celulares de 72h. No entanto, a concentração de OLZ (31,24µg/mL) utilizada pelos autores foi mil vezes maior que a

concentração testada aqui (0,03 $\mu$ g/mL) que está dentro da faixa de concentração plasmática terapêutica (MAURI et al., 2018).

De fato, em um protocolo *in vitro*, o uso de OLZ em uma concentração equivalente a terapêutica plasmática, pode ser mais realista, considerando a farmacocinética deste fármaco. No organismo, a OLZ é metabolizada pelo citocromo P450 e mais de 40% das doses orais são removidas pelo efeito hepático de primeira passagem (TELLES-CORREIA et al., 2017). Nessas condições, não é esperado que altas concentrações de OLZ cheguem às células do corpo periférico, incluindo macrófagos.

No Artigo 1, buscou-se avaliar a potencial ação do lítio na resposta pró-oxidativa e inflamatória, desencadeada pela OLZ, em células macrofágicas. Os resultados sugerem que o lítio pode reverter parcialmente a resposta oxi-inflamatória causada pela OLZ nas células macrofágicas.

Na prática psiquiátrica, apesar do lítio ser usado há décadas, os mecanismos envolvidos nos efeitos terapêuticos não estão totalmente esclarecidos (BARBISAN et al., 2017; BEUREL et al., 2012). Em relação ao perfil anti-nflamatório do lítio, alguns estudos sugerem que esse efeito seja decorrente da inibição da enzima GSK-3, envolvida em importantes vias de sinalização inflamatória. No entanto, há dados divergentes na literatura, descrevendo ações pró-inflamatórias do lítio (BARBISAN et al., 2017; BEUREL et al., 2012).

Estudos examinando os efeitos benéficos do lítio em combinação com a OLZ podem ajudar a entender o aumento na eficácia do tratamento de alguns sintomas psiquiátricos conferidos pelas terapias combinadas. Estudos clínicos demonstraram que o tratamento concomitante com OLZ e lítio reduziu o risco de reinternação após um episódio maníaco (ATKIN; NUÑEZ; GOBBI, 2017; WINGÅRD et al., 2017). Além disso, estudos anteriores sugerem que a co-administração de melatonina com OLZ e lítio, em adolescentes com transtorno bipolar, poderia reduzir o ganho de peso associado ao tratamento com OLZ (MOSTAFAVI et al., 2014). Os efeitos benéficos da co-administração demonstrada nesses estudos forneceram justificativa para nossa avaliação dos efeitos da OLZ e do lítio sobre o metabolismo oxidativo e inflamatório.

Em nosso estudo envolvendo a associação de lítio e OLZ, a concentração de lítio utilizada foi de 0,07 mEq/L, que foi previamente avaliada *in vitro* (BARBISAN et al., 2017, 2018a) e está dentro do intervalo de concentrações plasmáticas recomendadas para efeito terapêutico. Portanto, os resultados deste estudo podem ser representativos dos efeitos interativos *in vivo* entre OLZ e lítio.

Estudos anteriores apoiaram consistentemente a hipótese de que os efeitos oxii-inflamatórios da administração de OLZ estão associados a efeitos colaterais metabólicos (CILDIR; AKINCILAR; TERGAONKAR, 2013; WEISBERG et al., 2003). Além disso, as propriedades anti-inflamatórias do lítio também são bem caracterizadas e parecem contribuir para a redução da frequência de episódios maníacos em pacientes bipolares (BEUREL et al., 2012; MACHADO-VIEIRA; MANJI; ZARATE, 2009). No entanto, os efeitos potenciais da interação entre OLZ e lítio nos efeitos colaterais metabólicos não são claros. Por exemplo, o estudo realizado por Katagiri et al. (2012) não sugeriu nenhum impacto direto do tratamento com lítio sobre os efeitos colaterais da OLZ. Em contraste, demonstramos que o co-tratamento com OLZ e lítio resultou em diminuição de citocinas pró-inflamatórias e aumento dos níveis de IL-10, uma citocina anti-inflamatória.

Nossos resultados são colocados em contexto adequado, considerando os aspectos funcionais dos macrófagos em relação à resposta inflamatória. Os Macrófagos apresentam dois subtipos fenotípicos distintos: macrófagos classicamente e alternativamente ativados. Classicamente ativados, ou M1, os macrófagos são pró-inflamatórios e polarizados por antígenos como lipopolissacarídeo (LPS) e PHA, resultando na produção de citocinas pró-inflamatórias, como interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-6, IL-12, IL-23 e TNF- $\alpha$ . Por outro lado, alternativamente ativados, ou M2, macrófagos são células anti-inflamatórias e imunorreguladoras polarizadas por citocinas Th2, como IL-4 e IL-13. Células M2 também produzem citocinas antiinflamatórias, como IL-10 e TGF- $\beta$  (do inglês, *Transforming Growth Factor beta*). O papel do equilíbrio de polarização de macrófagos M1 / M2 na resposta de órgãos à inflamação ou lesão tem sido bem estabelecido (SHAPOURI-MOGHADDAM et al., 2018).

Quando a inflamação é desencadeada, os macrófagos exibem primeiro o fenótipo M1, liberando principalmente IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-12 em resposta. Conforme a fase M1 continua, podem ocorrer danos. Níveis mais altos de citocinas pró-inflamatórias indicam uma resposta inflamatória mais intensa pelos macrófagos M1. A conversão para o fenótipo M2 associada ao aumento da liberação de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10, é crucial na resolução do estado pró-inflamatório. Os macrófagos M2 são capazes de suprimir a inflamação, contribuindo para a reparação tecidual, remodelação, vasculogênese e manutenção da homeostase (SHAPOURI-MOGHADDAM et al., 2018).

Citocinas anti-inflamatórias produzidas por macrófagos ativados podem influenciar a resposta inflamatória de macrófagos de três maneiras: (1) supressão do fenótipo M1 na presença

de uma molécula de antígeno; (2) diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias; (3) conversão mais rápida do fenótipo M1 para M2 (SHAPOURI-MOGHADDAM et al., 2018).

Como a expressão gênica e os níveis proteicos são bons marcadores para a determinação da polarização de macrófagos, nossos resultados mostraram que a polarização M1 dos macrófagos RAW 264.7 foi bastante atenuada pelo tratamento com lítio, já que os níveis da maioria das citocinas permaneceram semelhantes ao grupo não tratado. Em contraste, polarização M1 clara foi observada em macrófagos tratados com OLZ, e esta resposta inflamatória foi parcialmente atenuada pela administração de lítio. Estes resultados suportam a hipótese de que o lítio pode atenuar a cascata inflamatória desencadeada pelo fármaco antipsicótico OLZ.

Cabe ressaltar que os macrófagos tratados apenas com lítio mostraram uma maior proliferação celular e níveis ligeiramente mais elevados de IL-1 $\beta$  do que o controle. Com base em estudos anteriores, uma ligeira ativação macrofágica pode ocorrer em resposta ao lítio, porque a linhagem de macrófagos RAW 264.7 é muito sensível a mudanças químicas no meio de cultura (BERGHAUS et al., 2010). Portanto, esses resultados podem representar uma limitação deste modelo *in vitro*, em vez de um verdadeiro efeito de lítio na ativação macrofágica.

Nossos resultados também mostraram um efeito do co-tratamento com lítio e OLZ sobre os marcadores do metabolismo oxidativo associados ao processo inflamatório. As células expostas apenas à OLZ produziram níveis mais elevados de superóxido, EROs e ON. No entanto, o lítio atenuou os níveis de marcadores oxidativos induzidos por OLZ. De particular interesse é o efeito do tratamento com OLZ sobre os níveis de ON, uma vez que o ON é uma importante molécula de sinalização pleiotrópica. O ON induz o aumento dependente da concentração da proliferação de células endoteliais, angiogênese e aceleração da cicatrização de feridas. Por outro lado, o ON é uma molécula oxidativa e também pode contribuir para induzir a inflamação (RATH et al., 2014).

Além do aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, os macrófagos M1 produzem aumento do ON via óxido nítrico sintase induzível (JUHAS et al., 2015). Em contraste, os macrófagos M2 são caracterizados pela expressão da enzima arginase, que hidrolisa a arginina em ornitina e uréia. Esta reação limita a disponibilidade de arginina para a síntese de ON (RATH et al., 2014). Portanto, a análise dos níveis de ON pode indicar o fenótipo de células macrofágicas. Co-tratamento com OLZ e lítio diminuiu significativamente os níveis de ON, apoiando a hipótese de que o lítio pode atenuar o efeito pró-inflamatório desencadeado pela OLZ.

A diminuição dos níveis de EROs nos macrófagos, decorrente do co-tratamento com OLZ e lítio, ressalta o benefício dessa interação na via inflamatória, uma vez que a evidência acumulada sustenta a hipótese de que a sinalização redox desempenha um papel na polarização de macrófagos (TAN et al., 2016). Além disso, a elevação de EROs pela OLZ resulta de mudanças no funcionamento mitocondrial, sugerindo que o lítio pode atuar na mitocôndria. No entanto, esta suposição é ainda especulativa, uma vez que não realizamos ensaios diretos de potencial disfunção mitocondrial desencadeada pela exposição a OLZ. Apesar dessa limitação metodológica, é importante ressaltar que alguns estudos anteriores sugeriram que os efeitos de antipsicóticos no metabolismo podem estar associados à alteração da função mitocondrial. Essa alteração, associada a um estado inflamatório crônico, pode contribuir para o desenvolvimento da síndrome metabólica em pacientes que usam fármacos antipsicóticos (BAIG et al., 2010; CONTRERAS-SHANNON et al., 2013).

Esta suposição é corroborada por um estudo recente realizado por Scaini et al. (2018) usando CMSPs de pacientes esquizofrênicos expostos a fármacos antipsicóticos. Os resultados deste estudo mostraram que esses fármacos podem induzir disfunção mitocondrial. As mitocôndrias são organelas chave responsáveis pela produção de energia e controlam muitos processos desde a sinalização até a morte celular. A função da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial é acoplada à produção de EROs na forma de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio. A superprodução de EROs mitocondrial e as alterações na homeostase redox mitocondrial estão envolvidas em várias condições neurológicas e somáticas (ANGELOVA; AMBRAMOV, 2018).

Como o tratamento com OLZ em macrófagos aumentou os níveis de superóxido e as EROs, o que inclui o  $H_2O_2$ , esses resultados sugerem indiretamente que esse fármaco pode causar disfunção mitocondrial. A atenuação da produção de EROs pela exposição ao lítio pode ser possível, como descrito em uma investigação realizada por Kim et al. (2016). Este estudo demonstrou que a disfunção mitocondrial e a peroxidação lipídica no córtex frontal de ratos desencadeada pela administração crônica de NMDA (N-metil D-Aspartato) foi parcialmente revertida pelo tratamento com lítio. Em humanos, De Sousa et al. (2015) mostraram que pacientes com transtorno bipolar tratados por seis semanas com lítio tiveram disfunção mitocondrial reduzida no Complexo I da cadeia de transporte de elétrons.

Apesar das limitações relacionadas aos estudos *in vitro*, nossos resultados destacam o potencial de uso do lítio como uma abordagem terapêutica adicional na prevenção dos efeitos oxidativos e inflamatórios desencadeados pelo OLZ. No entanto, mais estudos são necessários para esclarecer os mecanismos envolvidos no efeito protetor de lítio sobre a resposta

inflamatória induzida por OLZ e o impacto que o lítio pode ter na prevenção da síndrome metabólica em pacientes tratados com fármacos ASG.

Diante desses resultados, a exposição concomitante de OLZ e lítio, em macrófagos *in vitro*, sugere que o lítio pode atenuar a oxidação e a inflamação. Pode-se inferir que o uso concomitante de lítio pode contribuir para a atenuação de alguns efeitos adversos desencadeados pela administração de OLZ.

No artigo 2 é apresentado os resultados da curva de concentração do açai e a associação da OLZ com o açai. O açai, em todas as concentrações, não apresentou aumento da proliferação celular, nem aumento da produção dos níveis de EROs, dos níveis de ON, de citocinas inflamatórias ou caspases, indicando não estar estimulando ativação dos macrófagos e consequente resposta inflamatória ou apoptótica.

Por outro lado, de modo geral, as respostas oxidativas-inflamatórias provocadas pela OLZ nos macrófagos foram parcialmente revertidas quando as células foram expostas ao açai. Os primeiros resultados mostraram que todas as concentrações de extrato de açai foram capazes de reduzir a proliferação celular a níveis semelhantes as das células controle. Análises complementares confirmaram que o extrato de açai apresentou efeito em atenuar a ação oxi-inflamatória induzida por OLZ, como também, a resposta apoptótica. É possível que a elevação das concentrações de açai possa incrementar essa ação. A capacidade do açai para modular a resposta oxi-inflamatória de macrófagos expostos a OLZ está de acordo com a literatura (MACHADO et al., 2016; TOGAR et al., 2012; ULBRICHT et al., 2012). Além disso, os resultados poderiam indicar possíveis mecanismos subjacentes envolvendo regulação de vias inflamatórias clássicas (M1) e alternativas (M2). De fato, como já comentado, os macrófagos apresentam uma habilidade dinâmica para alterar suas características em resposta à sinalização do microambiente e podem ser polarizados para o fenótipo M1 ou M2 (ODEGAARD; CHAWLA, 2011). Dessa forma, o açai parece atuar nos dois fenótipos dos macrófagos, tendo em vista que o seu suplemento diminuiu as citocinas pró-inflamatórias e aumentou os níveis de IL-10, que é um marcador anti-inflamatório. Estes resultados corroboram investigações anteriores que descrevem, por exemplo, que o açai foi capaz de inibir a diferenciação e atividade dos osteoclastos, que são processos diretamente associados a estados inflamatórios (BRITO et al., 2016). Estudos realizados em modelos animais, também descreveram que a polpa do açai foi capaz de melhorar cognição em ratos idosos e atenuar a sinalização inflamatória em células microgliais BV-2 (CAREY et al., 2017).

Os efeitos anti-inflamatórios do extrato de açai sobre os macrófagos expostos a OLZ são possivelmente consequência de moléculas bioativas presentes em sua matriz química

(YAMAGUCHI et al., 2015). O extrato de açaí obtido e utilizado em nossos experimentos possui vários polifenóis, como a orientina, ácido p-cumárico, apigenina, cianidina-3-O-glucosídeo, luteolina, epicatequina, entre outros, como previamente caracterizado por Machado et al. (2016). Algumas destas moléculas isoladas já foram investigadas por possuírem atividades biológicas chaves, por exemplo: a) a orientina apresenta atividades antioxidantes, neuroprotetoras e antiinflamatórias consideráveis (TIAN et al., 2018; YOO et al., 2014); b) o ácido p-cumárico tem importantes propriedades antioxidantes (CHACKO et al., 2015); c) a apigenina exerce efeitos antioxidantes e neuroprotetores (NABAVI et al., 2018). É possível que essas moléculas e outros constituintes minoritários da matriz química do açaí, além de atuarem por suas atividades antioxidante e antiinflamatória, reduzindo os níveis de EROs, ON e de indicadores pró-inflamatórios, podem estar modulando outras vias, como observado aqui. De fato, o açaí foi capaz de reduzir a expressão das caspases 3 e 8, diminuindo conseqüentemente a via de sinalização pró-apoptótica desencadeada pela OLZ.

Os resultados sugerem que o extrato de açaí pode ser útil para atenuar estados inflamatórios periféricos desencadeados pelo uso de OLZ em pacientes portadores de doenças neuropsiquiátricas, como esquizofrenia e transtorno bipolar. A partir destes resultados poderão ser úteis investigações adicionais associadas ao desenvolvimento de suplementos terapêuticos de extrato de açaí.

## 7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados encontrados a partir da realização desse estudo nossas conclusões são que:

- a) a OLZ exposta a linhagem de macrófagos RAW 264.7, na faixa de concentração equivalente a recomendada no plasma, para efeito terapêutico, desencadeou uma resposta oxidativa-inflamatória;
- b) o lítio apresentou uma resposta oxidativa-inflamatória paradoxal. Quando a linhagem de macrófagos RAW 264.7 foi somente exposta a este fármaco ocorreu uma tênue resposta inflamatória *per se*. Entretanto, esta resposta pode ser associada a alta sensibilidade desta linhagem a presença de moléculas bioativas no meio de cultura. Por outro lado, o lítio foi capaz de reduzir a resposta oxidativa-inflamatória desencadeada pela OLZ sugerindo que, nesta linhagem de macrófagos o seu efeito anti-inflamatório é maior do que o efeito pró-inflamatório da OLZ. Os efeitos conduzidos demonstraram clara ação farmacogenômica tanto do lítio quanto da OLZ via regulação diferencial da expressão gênica de citocinas da rota inflamatória;
- c) o extrato de açaí exposto a linhagem de macrófagos RAW 264.7 não desencadeou uma resposta oxidativa-inflamatória *per se*. Adicionalmente, na presença de OLZ o açaí foi capaz de atenuar a resposta oxidativa-inflamatória e apoptótica desenvolvida por este psicofármaco, no modelo estudado;
- d) o conjunto dos resultados indicou que os efeitos pró-oxidativos e pró-inflamatórios da OLZ podem ser modulados via interações nutricionais e farmacológicas.

Apesar das limitações metodológicas relacionadas aos protocolos *in vitro*, a presente investigação abre caminho para estudos adicionais relacionados a interações nutricionais e farmacológicas que poderiam ser uma estratégia válida, na clínica médica, a fim de minimizar os efeitos adversos periféricos da OLZ.



## REFERÊNCIAS

ADAMS, J. The nursing role in the use of insulin coma therapy for schizophrenia in Britain, 1936–1965. **Journal of Advanced Nursing**, v. 70, n. 9, p. 2086-2094, 2014.

AKARSU, S. et al. Mitochondrial complex I and III gene mRNA levels in schizophrenia, and their relationship with clinical features. **Journal of Molecular Psychiatry**, v. 2, n. 1, p. 6, 2014.

ALBAUGH, V. L. et al. A double blind, placebo-controlled, randomized crossover study of the acute metabolic effects of olanzapine in healthy volunteers. **PLOS ONE**, v. 6, n. 8, p. e22662, 2011.

ALIYAZICIOĞLU, R. et al. Treatment with lithium, alone or in combination with olanzapine, relieves oxidative stress but increases atherogenic lipids in bipolar disorder. **Tohoku Journal of Experimental Medicine**, v. 213, n. 1, p. 79-87, 2007.

ALLISON, D. B. et al. Antipsychotic-induced weight gain: a comprehensive research synthesis. **American Journal of Psychiatry**, v. 156, n. 11, p. 1686-1696, 1999.

ANGELOVA, P. R.; ABRAMOV, A. Y. Role of mitochondrial ROS in the brain: from physiology to neurodegeneration. **FEBS Letters**, v. 592, n. 5, p. 692-702, 2018.

ARTERBURN, D. et al. Antipsychotic medications and extreme weight gain in two health systems. **Obesity Research and Clinical Practice**, v. 10, n. 4, p. 408-423, 2016.

ATKIN, T. A. et al. Disrupted in Schizophrenia-1 regulates intracellular trafficking of mitochondria in neurons. **Molecular Psychiatry**, v. 16, n. 2, p. 122-124, 2011.

ATKIN, T.; NUÑEZ, N.; GOBBI, G. Practitioner Review: The effects of atypical antipsychotics and mood stabilisers in the treatment of depressive symptoms in paediatric bipolar disorder. **Journal of Child Psychology and Psychiatry and Allied Disciplines**, v. 58, n. 8, p. 865-879, 2017.

BAIG, M. R. et al. Clozapine treatment causes oxidation of proteins involved in energy metabolism in lymphoblastoid cells: a possible mechanism for antipsychotic-induced metabolic alterations. **Journal of Psychiatric Practice**, v. 16, n. 5, p. 325-333, 2010.

BAKSHI, K.; CHANCE, S. A. The neuropathology of schizophrenia: a selective review of past studies and emerging themes in brain structure and cytoarchitecture. **Neuroscience**, v. 303, p. 82-102, 2015.

BALLON, J. S. et al. Molecular pathophysiology of metabolic effects of antipsychotic medications. **Trends in Endocrinology and metabolism**, v. 25, n. 11, p. 593-600, 2014.

BAN, T. Fifty years chlorpromazine: a historical perspective. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v. 3, n. 4, p. 495-500, 2007.

- BARBISAN, F. **A ação anti-inflamatória do lítio é influenciada por fatores genéticos, nutricionais e fármacos antidepressivos: estudos *in vitro***. 2017. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2017.
- BARBISAN, F. et al. Antidepressant drugs modulate differentially anti-inflammatory lithium's property: an *in vitro* and *in vivo* study. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 6, p. 287-304, 2018a.
- BARBISAN, F. et al. Genetic or pharmacological superoxide-hydrogen peroxide imbalances modulate the *in vitro* effects of lithium on glycogen synthase kinase-3 $\beta$ . **Gene**, v. 655, p. 48-55, 2018b.
- BARBISAN, F. et al. Methotrexate-related response on human peripheral blood mononuclear cells may be modulated by the Ala16Val-SOD2 gene polymorphism. **PLOS ONE**, v. 9, n. 10, p. 1-11, 2014.
- BARBISAN, F. et al. Xanthine-catechin mixture enhances lithium-induced anti-inflammatory response in activated macrophages *in vitro*. **BioMed Research International**, v. 2017, p. 1-10, 2017.
- BARBOSA, P. O. et al. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp dietary intake improves cellular antioxidant enzymes and biomarkers of serum in healthy women. **Nutrition**, v. 32, n. 6, p. 674-680, 2016.
- BAUMEISTER, A. A. The chlorpromazine enigma. **Journal of the History of the Neurosciences**, v. 22, n. 1, p. 14-29, 2013.
- BENNETT, M. R. Monoaminergic synapses and schizophrenia: 45 years of neuroleptics. **Journal of Psychopharmacology**, v. 12, n. 3, p. 289-304, 1998.
- BERGHAUS, L. J. et al. Innate immune responses of primary murine macrophage-lineage cells and RAW264.7 cells to ligands of Toll-like receptors 2, 3, and 4. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v. 33, n. 5, p. 443-454, 2010.
- BEUREL, E. et al. Glycogen synthase kinase-3 levels and phosphorylation undergo large fluctuations in mouse brain during development. **Bipolar Disorders**, v. 14, n. 8, p. 822-830, 2012.
- BISHARA, D. et al. Olanzapine: a systematic review and meta-regression of the relationships between dose, plasma concentration, receptor occupancy, and response. **Journal of Clinical Psychopharmacology**, v. 33, n. 3, p. 329-335, 2013.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Coordenação Geral do Componente Especializado da Assistência Farmacêutica. **Componente Especializado da Assistência Farmacêutica: inovação para a garantia do acesso a medicamentos no SUS**. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

- BRASLOW, J. Therapeutic effectiveness and social context: the case of lobotomy in a California state hospital, 1947-1954. **Western Journal of Medicine**, v. 170, n. 5, p. 293-296, 1999.
- BRENNER-LAVIE, H. et al. Dopamine modulates mitochondrial function in viable SH-SY5Y cells possibly via its interaction with complex I: relevance to dopamine pathology in schizophrenia. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1777, n. 2, p. 173-185, 2008.
- BRITO, C. et al. Extract of açai-berry inhibits osteoclast differentiation and activity. **Archives of Oral Biology**, v. 68, p. 29-34, 2016.
- BRÜNE, B. et al. Redox control of inflammation in macrophages. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 0, n. 0, p. 1-42, 2013.
- CADENAS, S. Mitochondrial uncoupling, ROS generation and cardioprotection. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1859, n. 9, p. 940-950, 2018.
- CAMPOS, S. D. S.; BOVI, M. L. A.; IADEROZA, M. Characterization of palm heart harvested from several crossing combinations between *E. oleracea* Mart and *E. edulis* Mart growing under different conditions. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 26, p. 637-646, 1991.
- CAREY, A. N. et al. Dietary supplementation with the polyphenol-rich açai pulps (*Euterpe oleracea* Mart. and *Euterpe precatoria* Mart.) improves cognition in aged rats and attenuates inflammatory signaling in BV-2 microglial cells. **Nutritional Neuroscience**, v. 20, n. 4, p. 238-245, 2017.
- CAVALLA, D. Case histories of drug discovery and SMR award meeting. **The Newsletter for Society for Medicines Research**, v. 6. N. 1, p. 6-9, 2000.
- CHACKO, S. M. et al. Protective effect of p-coumaric acid against doxorubicin induced toxicity in H9c2 cardiomyoblast cell lines. **Toxicology Reports**, v. 2, p. 1213-1221, 2015.
- CHIU, C. C. et al. The time-dependent change of insulin secretion in schizophrenic patients treated with olanzapine. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 34, n. 6, p. 866-870, 2010.
- CILDIR, G.; AKINCILAR, S. C.; TERGAONKAR, V. Chronic adipose tissue inflammation: all immune cells on the stage. **Trends in Molecular Medicine**, v. 19, n. 8, p. 487-500, 2013.
- CIPRIANI, A.; RENDELL, J.; GEDDES, J. R. Olanzapine in the long-term treatment of bipolar disorder: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Psychopharmacology**, v. 24, n. 12, p. 1729-1738, 2010.
- COCCURELLO, R.; MOLES, A. Potential mechanisms of atypical antipsychotic-induced metabolic derangement: clues for understanding obesity and novel drug design. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 127, n. 3, p. 210-251, 2010.
- COISSON, J. D. et al. *Euterpe oleracea* juice as a functional pigment for yogurt. **Food Research International**, v. 38, p. 893-897, 2005.

- CONTRERAS-SHANNON, V. et al. Clozapine-induced mitochondria alterations and inflammation in brain and insulin-responsive cells. **PLOS ONE**, v. 8, n. 3, 2013.
- CORDIOLI, A. V. et al. **Manual diagnóstico e estatístico de transtorno DSM-5**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.
- CRUMP, C. et al. Comorbidities and mortality in persons with schizophrenia: a Swedish national cohort study. **American Journal of Psychiatry**, v. 170, n. 3, p. 324-333, 2013.
- CRUVINEL, W. M. et al. Sistema imunitário - Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 4, p. 434-461, 2010.
- DA CRUZ JUNG, I. E. et al. Haloperidol and Risperidone at high concentrations activate an in vitro inflammatory response of RAW 264.7 macrophage cells by induction of apoptosis and modification of cytokine levels. **Psychopharmacology**, v. 233, n. 9, p. 1715-1723, 2016.
- DAYABANDARA, M. et al. Antipsychotic-associated weight gain: management strategies and impact on treatment adherence. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v. 13, p. 2231-2241, 2017.
- DE OLIVEIRA, P. R. et al. Effects of an extract obtained from fruits of *Euterpe oleracea* Mart. in the components of metabolic syndrome induced in C57BL/6J mice fed a high-fat diet. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 56, n. 6, p. 619-626, 2010.
- DE OLIVEIRA, P. R. B. et al. *Euterpe oleracea* Mart.-derived polyphenols protect mice from diet-induced obesity and fatty liver by regulating hepatic lipogenesis and cholesterol excretion. **PLOS ONE**, v. 10, n. 12, p. 1-16, 2015.
- DE SOUSA, R. T. et al. Lithium increases leukocyte mitochondrial complex I activity in bipolar disorder during depressive episodes. **Psychopharmacology**, v. 232, n. 1, p. 245-250, 2015.
- DEL-ÁNGEL, M. et al. Anti-inflammatory effect of natural and semi-synthetic phthalides. **European Journal of Pharmacology**, v. 752, p. 40-48, 2015.
- DUARTE, T. et al. The effects of rosuvastatin on lipid-lowering, inflammatory, antioxidant and fibrinolytic blood biomarkers are influenced by Val16Ala superoxide dismutase manganese-dependent gene polymorphism. **Pharmacogenomics Journal**, v. 16, n. 6, p. 501-506, 2016.
- DUARTE, T. et al. The influence of a xanthine-catechin chemical matrix on in vitro macrophage-activation triggered by antipsychotic ziprasidone. **Inflammation**, p. 1-11, 2018.
- ELMORSY, E.; SMITH, P. A. Bioenergetic disruption of human micro-vascular endothelial cells by antipsychotics. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 460, n. 3, p. 857-862, 2015.

- FEHSEL, K. et al. Clozapine induces oxidative stress and proapoptotic gene expression in neutrophils of schizophrenic patients. **Journal of Clinical Psychopharmacology**, v. 25, n. 5, p. 419-426, 2005.
- FITÓ, M. L. A. et al. Bioavailability and antioxidant effects of olive oil phenolic compounds in humans: a review. **Annali dell'Istituto Superiore Di Sanita**, v. 43, n. 4, p. 375-381, 2007.
- FUKUHARA, A. et al. Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. **Science**, v. 307, n. 5708, p. 426-430, 2005.
- FULLERTON, J. N.; GILROY, D. W. Resolution of inflammation: a new therapeutic frontier. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 15, n. 8, p. 551-567, 2016.
- GALLING, B. et al. Type 2 diabetes mellitus in youth exposed to antipsychotics: a systematic review and meta-analysis. **JAMA Psychiatry**, v. 73, n. 3, p. 247-259, 2016.
- GASSÓ, P. et al. Neurotoxic/neuroprotective activity of haloperidol, risperidone and paliperidone in neuroblastoma cells. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 36, n. 1, p. 71-77, 2012.
- GAUTAM, S.; MEENA, P. S. Drug-emergent metabolic syndrome in patients with schizophrenia receiving atypical (second generation) antipsychotics. **Indian Journal of Psychiatry**, v. 53, n. 2, p. 128-133, 2011.
- GOLDSTEIN, S.; MEYERSTEIN, D.; CZAPSKI, G. The Fenton reagents. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 15, n. 4, p. 435-445, 1993.
- GONÇALVES, P.; ARAÚJO, J. R.; MARTEL, F. Antipsychotics-induced metabolic alterations: Focus on adipose tissue and molecular mechanisms. **European Neuropsychopharmacology**, v. 25, n. 1, p. 1-16, 2015.
- GRUNZE, H. et al. The World Federation of Societies of Biological Psychiatry (WFSBP) guidelines for the biological treatment of bipolar disorders: acute and longterm treatment of mixed states in bipolar disorder. **World Journal of Biological Psychiatry**, v. 19, n. 1, p. 2-58, 2018.
- HAHN, M. K. et al. Acute effects of single-dose olanzapine on metabolic, endocrine, and inflammatory markers in healthy controls. **Journal of Clinical Psychopharmacology**, v. 33, n. 6, p. 740-746, 2013.
- HIRSCH, L. et al. Second-generation antipsychotics and metabolic side effects: a systematic review of population-based studies. **Drug Safety**, v. 40, n. 9, p. 771-781, 2017.
- HOEFLICH, K. P. et al. Requirement for glycogen synthase kinase-3beta in cell survival and NF-kappaB activation. **Nature**, v. 406, n. 6791, p. 86-90, 2000.
- HOTAMISLIGIL, G. S.; SHARGILL, N. S.; SPIEGELMAN, B. M. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. **Science**, v. 259, n. 5091, p. 87-91, 1993.

- HOTAMISLIGIL, G. S. et al. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha- and obesity-induced insulin resistance. **Science**, v. 271, n. 5249, p. 665-668, 1996.
- IDANPAAN-HEIKKILA, J. et al. Clozapine and agranulocytosis. **The Lancet**, v. 306, n. 7935, p. 611, 1975.
- JANICK, J.; PAUL, R. E. Areaceae. In: JANICK, J.; PAUL, R. E. (Org.). **Encyclopedia of fruits and nuts**. Cambridge, MA: CABI, 2008. p. 128-130.
- JOBIM, M. L. et al. Antimicrobial activity of Amazon *Astrocaryum aculeatum* extract and its association to oxidative metabolism. **Microbiological Research**, v. 169, n. 4, p. 314-323, 2014.
- JUHAS, U. et al. Different pathways of macrophage activation and polarization. **Postepy Hig Med Dosw**, v. 69, p. 496-502, 2015.
- KAHN, R. S. et al. Schizophrenia. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 1, p. 15067, 2015.
- KATAGIRI, H. et al. Efficacy and safety of olanzapine in the treatment of Japanese patients with bipolar i disorder in a current manic or mixed episode: A randomized, double-blind, placebo- and haloperidol-controlled study. **Journal of Affective Disorders**, v. 136, n. 3, p. 476-484, 2012.
- KHAIROVA, R. et al. Effects of lithium on oxidative stress parameters in healthy subjects. **Molecular Medicine Reports**, v. 5, n. 3, p. 680-682, 2012.
- KIM, H. K. et al. Mitochondrial dysfunction and lipid peroxidation in rat frontal cortex by chronic NMDA administration can be partially prevented by lithium treatment. **Journal of Psychiatric Research**, v. 76, p. 59-65, 2016.
- KIRKHAM, J. et al. Antipsychotic use in dementia. **Canadian Journal of Psychiatry**, v. 62, n. 3, p. 170-181, 2017.
- KIRKINEZOS, I. G.; MORAES, C. T. Reactive oxygen species and mitochondrial diseases. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 12, n. 6, p. 449-457, 2001.
- KOMOSSA, K. et al. **Olanzapine** versus other atypical antipsychotics for schizophrenia. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 3, p. CD006654, 2010.
- KUMAR, A. et al. Potential drug targets and treatment of schizophrenia. **Inflammopharmacology**, 25, n. 3, p. 277-292, 2017.
- LACKEY, D. E.; OLEFSKY, J. M. Regulation of metabolism by the innate immune system. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 12, n. 1, p. 15-28, 2016.
- LAURSEN, T. M.; NORDENTOFT, M.; MORTENSEN, P. B. Excess early mortality in schizophrenia. **Annual Review of Clinical Psychology**, v. 10, p. 425-448, 2014.

- LEE, E.; CHOW, L. Y.; LEUNG, C. M. Metabolic profile of first and second generation antipsychotics among Chinese patients. **Psychiatry Research**, v. 185, n. 3, p. 456-458, 2011.
- LEE, J. G. et al. Effects of olanzapine on brain-derived neurotrophic factor gene promoter activity in SH-SY5Y neuroblastoma cells. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 34, n. 6, p. 1001-1006, 2010.
- LIEBERMAN, J. A. et al. Effectiveness of antipsychotic drugs in patients with chronic schizophrenia. **New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 12, p. 1209-1223, 2005.
- LIESA, M.; SHIRIHAI, O. S. Mitochondrial dynamics in the regulation of nutrient utilization and energy expenditure. **Cell Metabolism**, v. 17, n. 4, p. 491-506, 2013.
- LÓPEZ-MUÑOZ, F. et al. A history of the pharmacological treatment of bipolar disorder. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 7, p. 2143, 2018.
- LU, S. C. Glutathione synthesis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, n. 5, p. 3143-353, 2013.
- LUMENG, C. N.; SALTIEL, A. R. Inflammatory links between obesity and metabolic disease. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 121, n. 6, p. 2111-2117, 2011.
- MACHADO, A. K. et al. Guaraná (*Paullinia cupana*) improves the proliferation and oxidative metabolism of senescent adipocyte stem cells derived from human lipoaspirates. **Food Research International**, v. 67, p. 426-433, 2015.
- MACHADO, A. K. et al. Neuroprotective effects of açai (*Euterpe oleracea* Mart.) against rotenone *in vitro* exposure. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, p. 1-14, 2016.
- MACHADO-VIEIRA, R. Lithium, stress, and resilience in bipolar disorder: deciphering this key homeostatic synaptic plasticity regulator. **Journal of Affective Disorders**, v. 233, p. 92-99, 2018.
- MACHADO-VIEIRA, R.; MANJI, H. K.; ZARATE, C. A. The role of lithium in the treatment of bipolar disorder: Convergent evidence for neurotrophic effects as a unifying hypothesis. **Bipolar Disorders**, v. 2, p. 92-109, 2009.
- MAGLIARO, B. C.; SALDANHA, C. J. Clozapine protects PC-12 cells from death due to oxidative stress induced by hydrogen peroxide via a cell-type specific mechanism involving inhibition of extracellular signal-regulated kinase phosphorylation. **Brain Research**, v. 1283, p. 14-24, 2009.
- MALHI, G. S.; OUTHRED, T. Therapeutic mechanisms of lithium in bipolar disorder: recent advances and current understanding. **CNS Drugs**, v. 30, n. 10, p. 931-949, 2016.
- MALKUS, K. A.; TSIKA, E.; ISCHIROPOULOS, H. Oxidative modifications, mitochondrial dysfunction, and impaired protein degradation in Parkinson's disease: how neurons are lost in the Bermuda triangle. **Molecular Neurodegeneration**, v. 4, p. 24, 2009.

MALONEY, A. E.; SIKICH, L. Olanzapine approved for the acute treatment of schizophrenia or manic/mixed episodes associated with bipolar I disorder in adolescent patients. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v. 6, p. 749-766, 2010.

MATHEUS, M. E. et al. Inhibitory effects of *Euterpe oleracea* Mart. on nitric oxide production and iNOS expression. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, n. 2, p. 291-296, 2006.

MAURI, M. C. et al. Clinical pharmacokinetics of atypical antipsychotics: an update. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 57, n. 12, p. 1493-1528, 2018.

MELTZER, H. Y.; MASSEY, B. W. The role of serotonin receptors in the action of atypical antipsychotic drugs. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 11, n. 1, p. 59-67, 2011.

MILLAN, M. J. et al. Negative symptoms of schizophrenia: clinical characteristics, pathophysiological substrates, experimental models and prospects for improved treatment. **European Neuropsychopharmacology**, v. 24, n. 5, p. 645-692, 2014.

MOHAMED-ALI, V.; PINKNEY, J. H.; COPPACK, S. W. Adipose tissue as an endocrine and paracrine organ. **International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders**, v. 22, n. 12, p. 1145-1158, 1998.

MOREIRA, F. A.; GUIMARÃES, F. S. Mechanisms of antipsychotic medications: dopaminergic hypotheses. **Medicina**, v. 40, n. 1, p. 63-71, 2007.

MOSTAFAVI, A. et al. Melatonin decreases olanzapine induced metabolic side-effects in adolescents with bipolar disorder: A randomized double-blind placebo-controlled trial. **Acta Medica Iranica**, v. 52, n. 10, p. 734-739, 2014.

MOSTARDEIRO, C. P. et al. The *Pavonia xanthogloea* (Ekman, Malvaceae): phenolic compounds quantification, anti-oxidant and cytotoxic effect on human lymphocytes cells. **Pharmacognosy Magazine**, v. 10, n. 3, p. 630-638, 2014.

MRAZ, M.; HALUZIK, M. The role of adipose tissue immune cells in obesity and low-grade inflammation. **Journal of Endocrinology**, v. 222, n. 3, p. R113-R127, 2014.

MUÑIZ-MIRET, N. et al. The economic value of managing the açai palm (*Euterpe oleracea* Mart.) in the floodplains of the Amazon estuary. Pará, Brazil. **Forest Ecology and Management**, v. 87, n. 1-3, p. 163-173, 1996.

MURALEEDHARAN, A. et al. Assessment of DNA damage and repair efficiency in drug naïve schizophrenia using comet assay. **Journal of Psychiatric Research**, v. 68, p. 47-53, 2015.

NABAVI, S. F. et al. Apigenin as neuroprotective agent: of mice and men. **Pharmacological Research**, v. 128, p. 359-365, 2018.

NAKAJIMA, S. et al. Dopamine D<sub>2/3</sub> receptor occupancy following dose reduction is predictable with minimal plasma antipsychotic concentrations: an open-label clinical trial. **Schizophrenia Bulletin**, v. 42, n. 1, p. 212-219, 2016.

- NASSAR, A.; AZAB, A. N. Effects of lithium on inflammation. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 5, n. 6, p. 451-458, 2014.
- ODEGAARD, J. I.; CHAWLA, A. Alternative macrophage activation and metabolism. **Annual Review of Pathology**, v. 6, p. 275-297, 2011.
- OLFSON, M. et al. Premature mortality among adults with schizophrenia in the United States. **JAMA Psychiatry**, v. 72, n. 12, p. 1172-1181, 2015.
- OWEN, M. J.; SAWA, A.; MORTENSEN, P. B. Schizophrenia. **Lancet**, v. 388, n. 10039, p. 86-97, 2016.
- OZASA, R. et al. The antipsychotic OLZ induces apoptosis in insulin-secreting pancreatic  $\beta$  cells by blocking PERK-mediated translational attenuation. **Cell Structure And Function**, v. 38, n. 2, p. 183-195, 2013.
- PARK, S. W. et al. Protective effects of atypical antipsychotic drugs against MPP<sup>+</sup>-induced oxidative stress in PC12 cells. **Neuroscience Research**, v. 69, n. 4, p. 283-290, 2011.
- PERL, A. Oxidative stress in the pathology and treatment of systemic lupus erythematosus. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 9, n. 11, p. 674-686, 2013.
- PESSINA, A. et al. In vitro toxicity of clozapine, olanzapine, and quetiapine on granulocyte-macrophage progenitors (GM-CFU). **Pharmacopsychiatry**, v. 39, n. 1, p. 20-22, 2006.
- PESSOA, J. D. C.; DA SILVA E SILVA, P. V. Effect of temperature and storage on açai (*Euterpe oleracea*) fruit water uptake: simulation of fruit transportation and pre-processing. **Fruits**, v. 62, n. 5, p. 295-301, 2007.
- POULOSE, S. M. et al. Anthocyanin-rich açai (*Euterpe oleracea* Mart.) fruit pulp fractions attenuate inflammatory stress signaling in mouse brain BV-2 microglial cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 4, p. 1084-1093, 2012.
- RAO, R.; HAO, C. M.; BREYER, M. D. Hypertonic stress activates glycogen synthase kinase 3 $\beta$ -mediated apoptosis of renal medullary interstitial cells, suppressing an NF $\kappa$ B-driven cyclooxygenase-2-dependent survival pathway. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 6, p. 3949-3955, 2004.
- RATH, M. et al. Metabolism via arginase or nitric oxide synthase: Two competing arginine pathways in macrophages. **Frontiers in Immunology**, v. 27, n. 5, p. 532, 2014.
- RIZZUTO, R. et al. Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 13, n. 9, p. 566-578, 2012.
- RODRIGO, R.; GUICHARD, C.; CHARLES, R. Clinical pharmacology and therapeutic use of antioxidant vitamins. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 21, n. 2, p. 111-127, 2007.

- ROJO, L. E. et al. Metabolic syndrome and obesity among users of second generation antipsychotics: a global challenge for modern psychopharmacology. **Pharmacological Research**, v. 101, p. 74-85, 2015.
- ROSENFELDT, F. et al. Oxidative stress in surgery in an ageing population: pathophysiology and therapy. **Experimental Gerontology**, v. 48, n. 1, p. 45-54, 2013.
- SAGRILLO, M. R. et al. Tucuma fruit extracts (*Astrocaryum aculeatum* Meyer) decrease cytotoxic effects of hydrogen peroxide on human lymphocytes. **Food Chemistry**, v. 173, p. 741-748, 2015.
- SALVO, F. et al. Sudden cardiac and sudden unexpected death related to antipsychotics: A meta-analysis of observational studies. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 99, n. 3, p. 306-314, 2016.
- SANTO-DOMINGO, J.; DEMAUREX, N. Calcium uptake mechanisms of mitochondria. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1797, n. 6-7, p. 907-912, 2010.
- SANTOS, M. F. et al. Amazonian native palm fruits as sources of antioxidant bioactive compounds. **Antioxidants**, v. 4, n. 3, p. 591-602, 2015.
- SÁRVÁRI, A. K. et al. Atypical antipsychotics induce both proinflammatory and adipogenic gene expression in human adipocytes in vitro. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 450, n. 4, p. 1383-1389, 2014.
- SCAINI, G. et al. Second generation antipsychotic-induced mitochondrial alterations: Implications for increased risk of metabolic syndrome in patients with schizophrenia. **European Neuropsychopharmacology**, v. 28, n. 3, p. 369-380, 2018.
- SCHORETSANITIS, G. et al. TDM in psychiatry and neurology: A comprehensive summary of the consensus guidelines for therapeutic drug monitoring in neuropsychopharmacology, update 2017; a tool for clinicians. **World Journal of Biological Psychiatry**, v. 19, n. 3, p. 162-174, 2018.
- SCHRECKINGER, M. E. et al. Berries from South America: a comprehensive review on chemistry, health potential, and commercialization. **Journal of Medicinal Food**, v. 13, n. 2, p. 233-246, 2010.
- SEEMAN, P. et al. Antipsychotic drug doses and neuroleptic/dopamine receptors. **Nature**, v. 261, p. 717-719, 1976.
- SHAPOURI-MOGHADDAM, A. et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. **Journal of Cellular Physiology**, v. 233, n. 9, p. 6425-6440, 2018.
- SILVA, H. Socio-ecology of health and disease: the effects of invisibility on the caboclo populations of the Amazon. In: ADAMS, C. et al. (Eds.). **Amazon peasant societies in a changing environment**. Dordrecht: Springer, 2008. p. 307-333.

- SOUZA FILHO, O. C. et al. The in vitro genotoxic effect of Tucuma (*Astrocaryum aculeatum*), an Amazonian fruit rich in carotenoids. **Journal of Medicinal Food**, v. 16, n. 11, p. 1013-1021, 2013.
- SOUZA-MONTEIRO, J. R. et al. Anticonvulsant properties of *Euterpe oleracea* in mice. **Neurochemiatry International**, v. 90, p. 20-27, 2015.
- SPADA, P. D. et al. Frozen fruit pulp of *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) prevents hydrogen peroxide-induced damage in the cerebral cortex, cerebellum, and hippocampus of rats. **Journal of Medicinal Food**, v. 12, n. 5, p. 1084-1088, 2009.
- STAPEL, B. et al. Second generation atypical antipsychotics olanzapine and aripiprazole reduce expression and secretion of inflammatory cytokines in human immune cells. **Journal of Psychiatric Research**, v. 105, p. 95-102, 2018.
- STEPHENS, P. A review of clozapine: an antipsychotic for treatment-resistant schizophrenia. **Comprehensive Psychiatry**, v. 31, n. 4, p. 315-326, 1990.
- STEPPAN, C. M.; LAZAR, M. A. The current biology of resistin. **Journal of Internal Medicine**, v. 255, p. 439-447, 2004.
- STRECK, E. L.; CZAPSKI, G. A.; SILVA, C. G. da. Neurodegeneration, mitochondrial dysfunction, and oxidative stress. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2013, p. 1-2, 2013.
- STRUDWICK, J.; SOBEL, G. I. Uses of *Euterpe oleracea* Mart in the Amazon Estuary, Brazil. **Advances in Economic Botany**, v.6, p. 225-253, 1988.
- STURM, A. S. et al. Efficacy and safety of atypical **antipsychotics** for behavioral symptoms of **dementia** among patients residing in long-term care. **International Journal of Clinical Pharmacy**, v. 40, n. 1, p. 135-142, 2018.
- SUBRAMANIAM, M. Body mass index, obesity, and psychopathology in patients with schizophrenia. **Journal of Clinical Psychopharmacology**, v. 34, n. 1, p. 40-46, 2014.
- SUN, X. et al. Downregulation in components of the mitochondrial electron transport chain in the postmortem frontal cortex of subjects with bipolar disorder. **Journal of Psychiatry & Neuroscience**, v. 31, n. 3, p. 189-196, 2006.
- TAN, H. Y. et al. The Reactive Oxygen Species in Macrophage Polarization: Reflecting Its Dual Role in Progression and Treatment of Human Diseases. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, 2016.
- TAN, Q. R. et al. Differential effects of classical and atypical antipsychotic drugs on rotenone-induced neurotoxicity in PC12 cells. **European Neuropsychopharmacology**, v. 17, n. 12, p. 768-773, 2007.
- TELLES-CORREIA, D. et al. Psychotropic drugs and liver disease: A critical review of pharmacokinetics and liver toxicity. **World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics**, v. 8, n. 1, p. 26-38, 2017.

- TIAN, T. et al. Neuroprotective effects of orientin on oxygen-glucose deprivation/reperfusion-induced cell injury in primary culture of rat cortical neurons. **Experimental Biology and Medicine**, v. 243, n. 1, p. 78-86, 2018.
- TOGAR, B. et al. The genotoxic potentials of some atypical antipsychotic drugs on human lymphocytes. **Toxicology and Industrial Health**, v. 28, p. 327-333, 2012.
- TOKER, L. et al. Inositol-related gene knockouts mimic lithium's effect on mitochondrial function. **Neuropsychopharmacology**, v. 39, n. 2, p. 319-328, 2014.
- TRAYHURN, P.; WOOD, I. S. Signalling role of adipose tissue: adipokines and inflammation in obesity. **Biochemical Society Transactions**, v. 33, n. 5, p. 1078-1081, 2005.
- TWIG, G. et al. Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. **EMBO Journal**, v. 27, n. 2, p. 433-446, 2008.
- ULBRICHT, C. et al. An evidence-based systematic review of açai (*Euterpe oleracea*) by the natural standard research collaboration. **Journal of Dietary Supplements**, v. 9, n. 2, p. 128-147, 2012.
- VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.
- VERA, I. et al. Clozapine as treatment of first choice in first psychotic episodes. What do we know?. **Actas Espanolas De Psiquiatria**, v. 40, n. 5, p. 281-289, 2012.
- VESTRI, H. S. et al. Atypical antipsychotic drugs directly impair insulin action in adipocytes: effects on glucose transport, lipogenesis, and antilipolysis. **Neuropsychopharmacology**, v. 32, n. 4, p. 765-772, 2007.
- VICENT, H. K.; INNES, K. E.; VINCENT, K. R. Oxidative stress and potential interventions to reduce oxidative stress in overweight and obesity. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 9, n. 6, p. 813-839, 2007.
- VICTORIANO, M. et al. Olanzapine-induced accumulation of adipose tissue is associated with an inflammatory state. **Brain Research**, v. 1350, p. 167-175, 2010.
- VUCICEVIC, L. et al. Autophagy inhibition uncovers the neurotoxic action of the antipsychotic drug olanzapine. **Autophagy**, v. 10, n. 12, p. 2362-2378, 2014.
- WAWRZYCKA-GORCZYCA, I. et al. Crystal structure of olanzapine and its solvates. Part 3. Two and three-component solvates with water, ethanol, butan-2-ol and dichloromethane. **Journal of Molecular Structure**, v. 830, n. 1-3, p. 188-197, 2007.
- WEISBERG, S. P. et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **Journal of Clinical Investigation**, v. 112, n. 12, p. 1796-1808, 2003.
- WERNER, F. M.; COVEÑAS, R. Safety of antipsychotic drugs: focus on therapeutic and adverse effects. **Expert Opinion on Drug Safety**, v. 13, n. 8, p. 1031-1042, 2014.

WINGÅRD, L. et al. Reducing the rehospitalization risk after a manic episode: A population based cohort study of lithium, valproate, olanzapine, quetiapine and aripiprazole in monotherapy and combinations. **Journal of Affective Disorders**, v. 217, p. 16-23, 2017.

WONG, D. Y. S. et al. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) berry extract exerts neuroprotective effects against  $\beta$ -amyloid exposure in vitro. **Neuroscience Letters**, v. 556, p. 221-226, 2013.

YAMAGUCHI, K. K. D. L. et al. Amazon açai: chemistry and biological activities: a review. **Food Chemistry**, v. 179, p. 137-151, 2015.

YOO, H. et al. Orientin inhibits HMGB1-induced inflammatory responses in HUVECs and in murine polymicrobial sepsis. **Inflammation**, v. 37, n. 5, p. 1705-1717, 2014.

ZHANG, F. et al. Leptin: structure, function and biology. **Vitamins and Hormones**, v. 71, p. 345-372, 2005.

ZHANG, Q. et al. Effects of olanzapine on the elevation of macrophage infiltration and pro-inflammatory cytokine expression in female rats. **Journal of Psychopharmacology**, v. 28, n. 12, p. 1161-1169, 2014a.

ZHANG, X. Y. et al. Cognitive function, plasma MnSOD activity, and MnSOD Ala-9Val polymorphism in patients with schizophrenia and normal controls. **Schizophrenia Bulletin**, v. 40, n. 3, p. 592-601, 2014b.



## ANEXO A - COMPROVANTE DE PUBLICAÇÃO ARTIGO 1



## RESEARCH ARTICLE

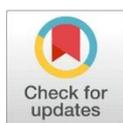
# Lithium is able to minimize olanzapine oxidative-inflammatory induction on macrophage cells

Marcelo Soares Fernandes<sup>1,2</sup>✉, Fernanda Barbisan<sup>3</sup>✉, Verônica Farina Azzolin<sup>3</sup>, Pedro Antônio Schmidt do Prado-Lima<sup>4</sup>, Cibele Ferreira Teixeira<sup>1</sup>, Ivo Emílio da Cruz Jung<sup>1</sup>, Charles Elias Assmann<sup>5</sup>, Rogerio Tomasi Riffel<sup>2,6</sup>, Marta Maria Medeiros Frescura Duarte<sup>1,7</sup>, Ednea Maia Aguiar-Ribeiro<sup>8</sup>, Ivana Beatrice Mânica da Cruz<sup>1,3\*</sup>

**1** Pharmacology Graduate Program, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil, **2** Federal University of the Southern Frontier, Passo Fundo, RS, Brazil, **3** Gerontology Graduate Program, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil, **4** Brain Institute, Catholic University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, Brazil, **5** Biochemical Toxicology Graduate Program, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil, **6** Hospital of Clinics of Passo Fundo, Passo Fundo, RS, Brazil, **7** Lutheran University of Brazil, Santa Maria- RS, Brazil, **8** Open University of the Third Age, State University of Amazonas, Manaus-AM, Brazil

✉ These authors contributed equally to this work.

\* ivana.ufsm@gmail.com



## OPEN ACCESS

**Citation:** Fernandes MS, Barbisan F, Azzolin VF, do Prado-Lima PAS, Teixeira CF, da Cruz Jung IE, et al. (2019) Lithium is able to minimize olanzapine oxidative-inflammatory induction on macrophage cells. PLoS ONE 14(1): e0209223. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209223>

**Editor:** Oleg Lunov, ASCR, Institute of Physics, CZECH REPUBLIC

**Received:** July 22, 2018

**Accepted:** November 30, 2018

**Published:** January 29, 2019

**Copyright:** © 2019 Fernandes et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All data used in this paper are available and can be viewed in the public repository: <https://figshare.com/s/d96c419a9c4218839088>.

**Funding:** This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas. The funders had no role in study

## Abstract

### Background

Olanzapine (OLZ) is a second-generation antipsychotic drug used for treatment of schizophrenia, bipolar disorder, and other neuropsychiatric conditions. Undesirable side effects of OLZ include metabolic alterations associated with chronic oxidative-inflammation events. It is possible that lithium (Li), a mood modulator that exhibits anti-inflammatory properties may attenuate OLZ-induced oxi-inflammatory effects.

### Methodology

To test this hypothesis we activated RAW 264.7 immortalized macrophages with OLZ and evaluated oxidation and inflammation at the gene and protein levels. Li and OLZ concentrations were determined using estimated plasma therapeutic concentrations.

### Results

OLZ triggered a significant increase in macrophage proliferation at 72 h. Higher levels of oxidative markers and proinflammatory cytokines, such as TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6, with a concomitant reduction in IL-10, were observed in OLZ-exposed macrophages. Lithium (Li) exposure triggered a short and attenuated inflammatory response demonstrated by elevation of superoxide anion (SA), reactive oxygen species (ROS), IL-1 $\beta$ , and cellular proliferation followed by elevation of anti-inflammatory IL-10 levels. Li treatment of OLZ-supplemented macrophages was able to reverse elevation of oxidative and inflammatory markers and increase IL-10 levels.

design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

## Conclusions

Despite methodological limitations related to *in vitro* protocols, results suggested that Li may attenuate OLZ-induced oxidative and inflammatory responses that result from metabolic side effects associated with OLZ.

## Introduction

Olanzapine (OLZ) is an atypical antipsychotic drug of the thienobenzodiazepine class. OLZ blocks multiple neurotransmitter receptors, including D2 and 5-HT<sub>3</sub> receptors. OLZ is used to treat resistant and non-resistant schizophrenia in children and adolescents [1,2], therapeutic maintenance of bipolar disorder [2,3], management of agitation in adults with progressive dementia [4], and treatment of Huntington's Disease [5,6]. Moreover, OLZ is used to attenuate chemotherapy-induced nausea and vomiting, including in children under 13 years of age [7,8].

OLZ has pleiotropic effects by acting on diverse neurotransmission pathways. However, the non-specific nature of this antipsychotic drug results in numerous metabolic side effects including weight gain, dry mouth, somnolence, constipation, and increased appetite. Clinical studies, such as Ferno et al [9], showed dose-dependent lipogenic effects due 5-HT<sub>2C</sub> and H1 receptor antagonism after the first 6 weeks of treatment. Furthermore, OLZ causes glycemic disruptions associated with increased risk of developing type 2 diabetes mellitus. Continuous use of OLZ has been associated with higher cardiovascular risk [10].

Studies have suggested that chronic inflammatory processes, via macrophages and inflammatory cytokines, may be responsible for increased risk of obesity [11]. In fact, oxidative-inflammatory mechanisms have been hypothesized to play a role in onset of metabolic side effects associated with OLZ administration [12,13]. This OLZ action involves macrophages activation, that is a cell presenting in blood and in tissues such as fat-tissue [14–15]. Exposure of human adipose-derived stem cells to several antipsychotics, including OLZ, resulted in up-regulation on gene expression and levels of pro-inflammatory cytokines such as IL-1 $\beta$ , NF- $\kappa$  $\beta$ , and IL-8, suggesting a direct effect on the immune system [13].

Furthermore, administration of OLZ for five weeks resulted in weight gain, increased visceral fat, infiltration of macrophages, and higher TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6 levels in rat fat-tissue [15,16]. OLZ was also able to upregulate macrophage migration inhibitory factor in adipose tissue reducing lipolysis and increasing lipogenic pathways [17].

Indeed, exposure of human adipose-derived stem cells to several antipsychotics, including OLZ, resulted in up-regulation on gene expression and levels of pro-inflammatory cytokines such as IL-1 $\beta$ , NF- $\kappa$  $\beta$ , and IL-8, suggesting a direct effect on the immune system [13]. Furthermore, administration of OLZ for 5 weeks resulted in weight gain, increased visceral fat, infiltration of macrophages, and increased levels of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6 in rat adipose tissue and hypothalamus [15].

As polypharmacy is a common clinical practice, investigation of whether psychiatric drugs with anti-inflammatory properties may attenuate metabolic side effects of pro-inflammatory drugs when administered simultaneously [18]. This is the Lithium (Li) case, that is an efficient mood modulator molecule concomitantly used in management of acute mania or manic episodes associated with bipolar disorder [19] and to treat some mixed episodes of major depressive and bipolar disorders [20]. Moreover, the combination of Li plus OLZ has been indicated to treat some mixed episodes of major depressive and bipolar disorders [2,20]. Previous *in vitro* study also suggested that Li could modulate *in vitro* proinflammatory macrophage

response exposed to some antidepressant drugs [21]. To test this hypothesis, an *in vitro* study was performed here using RAW 264.7 macrophages exposed at different OLZ and Li at a plasma therapeutic range concentration.

## Material and methods

### Chemicals and equipment

All chemicals and reagents used in this study were analytical grade and purchased from Merck (Darmstadt, Germany) or Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA). All experiments were performed using pure Li, obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Plastics and reagents used for cell culture procedures were acquired from Gibco (Thermo Fisher Scientific; Grand Island, NY, USA). Molecular biology reagents were as follows: TRIzol reagent (Thermo Fisher Scientific; Grand Island, NY, USA), iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad Laboratories; Hercules, CA, USA), DNase (Invitrogen Life Technologies; Carlsbad, CA, USA), QuantiFast SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Immunoassay Kits were purchased from Abcam (Cambridge, MA- USA). Protocols involving spectrophotometric and fluorimetric analysis were executed using a 96-well microplate reader (SpectraMax M2/M2e Multimode Plate Reader; Molecular Devices- Sunnyvale, CA, USA).

### General experimental design

*In vitro* experiments were performed using a commercially available RAW 264.7 immortalized macrophage cell line (ATCC TIB-71) obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) cultured under standardized conditions. Cells were cultured using Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) with 10% fetal bovine serum (FBS), supplemented with 1% penicillin/streptomycin and 1% amphotericin B antifungal. Cell cultures were maintained at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> and expanded to obtain cell number to perform the experiments.

All protocols performed were similar to previously described studies by Barbisan et al. [22] and Duarte et al. [23] of *in vitro* psychotropic drug effects on macrophage inflammatory response. Macrophages are highly sensitive to antigens and other antigenic factors, which induce intense cellular proliferation and morphological changes. These alterations, especially cellular proliferation in 72 h cell cultures, can be used as markers of inflammatory activation of immune cells. A concentration-effect curve (0.007 to 1000 µg/mL) was generated using OLZ concentrations bracketing plasma therapeutic (0.02 and 0.08 µg/mL) OLZ values. OLZ plasma therapeutic values are published in guidelines for therapeutic drug monitoring in neuropsychopharmacology [24]. Phytohemagglutinin (PHA) antigen (125 µg/mL) treatment was used as a positive inflammatory control [21].

The OLZ concentration that triggered the highest inflammatory response was chosen and confirmed by evaluation of cytomorphological alteration, cell cycle modulation, and protein and gene expression analysis of pro- and anti-inflammatory cytokines. Following determination of OLZ concentration, macrophages were concomitantly exposed to OLZ plus Li at 0.7 mEq/L. This concentration was chosen based on Barbisan et al [21].

### Cell proliferation analysis

MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) tetrazolium reduction assay was used as a method to evaluate cell proliferation in 72 h cell cultures. This procedure was modified, but we used Mosmann [25] for guidance. Briefly, cells were seeded in 96-well plates at a final concentration of  $2 \times 10^5$  cells/mL and MTT reagent was added to the cells at a

final concentration of 0.5 mg/mL. After 1 h of incubation at 37°C, formazan crystals were solubilized using dimethyl sulfoxide (DMSO) and absorbance was recorded at 560 nm using a plate reading spectrophotometer (SpectraMax i3x Multi-Mode Microplate Reader; Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

### Cell cycle analysis

Cell cycle analysis was performed by flow cytometry. In short, cells were seeded in 6-well plates ( $1 \times 10^4$  cells). Following 72 h treatment, cells underwent resuspension in 70% ethanol and were stored overnight at  $-20^\circ\text{C}$ . After storage, cells were resuspended in 500  $\mu\text{L}$  of staining solution prepared in PBS, which consisted of 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  PI, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  RNase, and 0.05% Triton X-100, and incubated at 37°C for 40 min. Cell cycle analysis was performed using a BD Accuri C6 instrument [26].

### Oxidative markers analysis

Modulation of oxidative stress was evaluated in 72 h cell cultures exposed to OLZ and Li by analysis of superoxide, ROS, and nitric oxide levels. Superoxide levels were quantified using a colorimetric assay that produces a formazan salt via reaction with nitroblue tetrazolium (NBT) chloride, following a protocol previously published by Morabito et al. [27]. Briefly, the cells were seeded in a 96-well plate, diluted in  $1 \times$  PBS, treated with 10  $\mu\text{L}$  of NBT solution (10 mg/mL), homogenized, incubated at 37°C for 3 h, and centrifuged. 75  $\mu\text{L}$  of supernatant was removed, and an equal volume of DMSO was added to each well. After incubation for 20 min at 37°C, 75  $\mu\text{L}$  of the cell suspension was transferred to another 96-well plate, and the absorbance measured at 540 nm.

Total levels of reactive oxygen species (ROS) were quantified in RAW 264.7 cells using the 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) assay. DCFH-DA is a nonfluorescent chemical that is deacetylated by mitochondrial esterase enzymes to DCFH which reacts with ROS and becomes DCF, a fluorescent molecule. Fluorescence was recorded at an excitation wavelength of 488 nm and an emission wavelength of 525 nm [28]. NO levels were measured after 72 h by the Griess modified method [29]. In short, RAW 264.7 cells were incubated at room temperature with the Griess reagent for 10 min and the absorbance was recorded at 550 nm wavelength.

### Cytokine immunoassays

All analyses were performed in 72 h cell culture samples. Analysis of cytokine levels (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , and IL-10) provides information on activation of inflammatory pathways. Caspase levels (CASP-8, CASP-3 and CASP-1) may indicate activation of the apoptosis pathway. Cytokines levels in cell culture supernatants were measured, according to the manufacturer's instructions (Abcam, Cambridge, MA- USA).

Briefly, all reagents and working standards were prepared per manufacturer's instructions prior to adding 50  $\mu\text{L}$  of the assay diluent RD1W to each well. 100  $\mu\text{L}$  of standard control for each sample was added per well, after which the well was covered with an adhesive strip and incubated for 1.5 h at room temperature. Each well was subsequently aspirated and washed twice, for a total of three washes. The antiserum of each molecule analyzed into wells and the plate was covered with a new adhesive strip, and subsequently incubated for 30 min at room temperature. The aspiration/wash step was repeated, and the conjugate (100  $\mu\text{L}$ ) was added to each well and incubated for 30 min at room temperature. Each well was again aspirated and washed before adding 100  $\mu\text{L}$  of substrate solution to each well, followed by incubation at room temperature for an additional 20 min. Following incubation, 50  $\mu\text{L}$  of stop solution was

added to each well. Optical density was determined within 30 min at 450 nm using a microplate reader.

### Gene expression analysis

Gene expression of cytokines in RAW 264.7 macrophages (pro inflammatory *IL-1 $\beta$* , *IL-6*, *TNF- $\alpha$*  and anti-inflammatory *IL-10*) was analyzed by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) after 24 h of incubation [21]. Briefly, total RNA was isolated with TRIzol and quantified spectrophotometrically at 260 nm wavelength. Reverse transcription was performed using the iScript cDNA synthesis kit. RNA was added to a final concentration of 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  with 0.2  $\mu\text{L}$  of DNase. Generation of cDNA was performed using 1  $\mu\text{L}$  of iScript reverse transcriptase and 4  $\mu\text{L}$  of iScript Mix. Quantitative RT-PCR was performed in a total reaction volume of 20  $\mu\text{L}$  with 1  $\mu\text{L}$  of cDNA and 1x QuantiFast SYBR Green PCR Kit in a Rotor-Gene Q instrument (Qiagen, Hilden, Germany). The specific primer pairs of cytokines used in this study were: *IL-1 $\beta$*  Forward GCGGCATCCAGCTACGAAT and Reverse ACC AGCATCTTCC TCAGCTTGT; *IL-6* Forward TACCCCGAGGAGAAGATTCCA and Reverse CCGTCGAGG ATG TACCGAATT; *TNF- $\alpha$*  Forward CAA CGGCATGGATCTCAAAGAC and Reverse TATGGGCTC ATACCAGGGTTTG; *IL-10* Forward GTGATGCCCAAGCTGAGA and Reverse TGCTTTG TTTTCACAGGGAAGA. Beta-actin, a housekeeping gene was used as an internal control. Relative expression was calculated using comparative CT (Cytosine-Timine) and was expressed as the fold expression compared to the control.

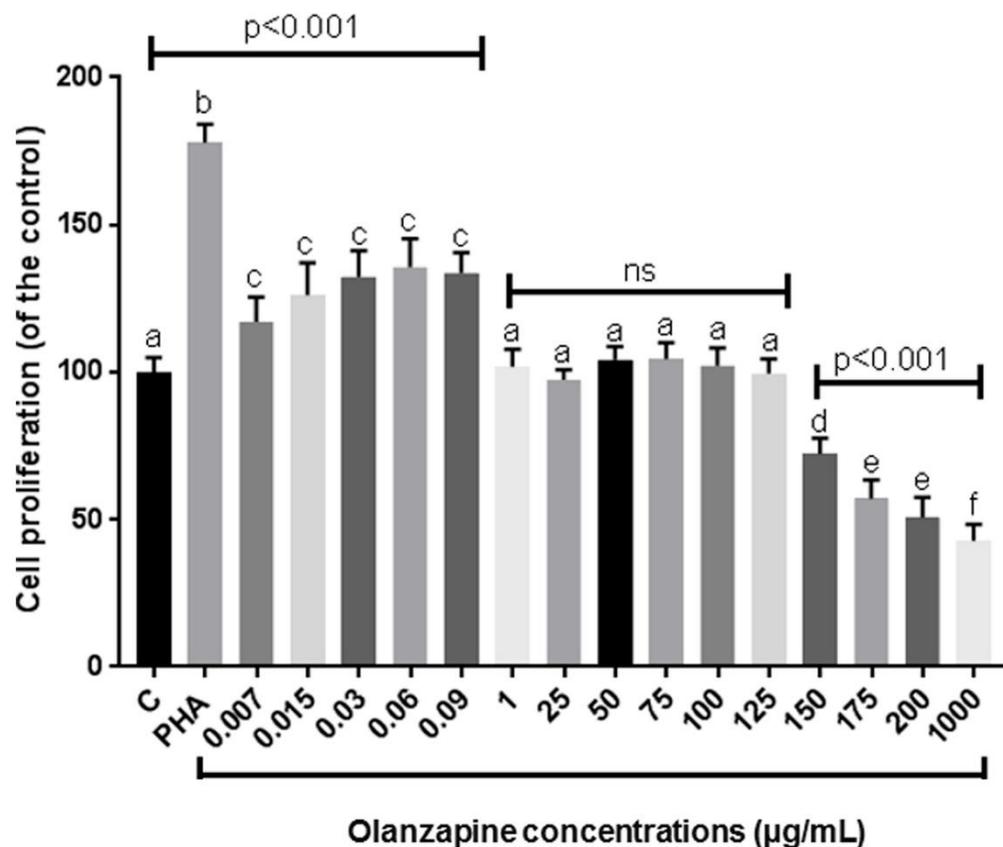
### Statistical analyses

The results obtained from all in vitro protocols were analyzed using GraphPad *Prism 6* statistical package software. All experiments were performed in independent triplicates. This data treatment protocol is broadly used in the in vitro analysis in order to allow comparison among results obtained from different days or by different laboratories [30]. Outliers were eliminated considering upper and lower values of 2-SD range since indicated some experimental imprecision. All variables were tested for distribution normality using the Shapiro-Wilk method. Data were compared with one-way or two-way analysis of variance followed by Tukey's post hoc tests. Data are presented as mean  $\pm$  SD relative to negative control group. The alpha value was  $p \leq 0.05$  to indicate the threshold for statistical significance.

### Results

Macrophage proliferation in response to OLZ was evaluated as an indicator of oxi-inflammatory activation (Fig 1). Results showed a hormetic response to OLZ in macrophages, with lower OLZ concentrations (0.007–0.09  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) resulting in increased cellular proliferation, while higher concentrations significantly decreased growth of cultures, indicating a cytotoxic or immunosuppressive OLZ effect (150–1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). The pro-inflammatory effect of OLZ at lower concentrations was confirmed by comparison to a similar response triggered by macrophage exposure to PHA antigen.

From this first analysis, OLZ at 0.03  $\mu\text{g}/\text{mL}$  concentration was chosen to conduct complementary protocols, since this concentration increased cell proliferation and was into the plasma therapeutic range of this drug. Complementary analysis was performed to confirm that this concentration could trigger macrophage activation by evaluation of cell cycle modulation and cytomorphological macrophage patterns in 72h cell cultures (Fig 2). Macrophages OLZ-exposed presented higher frequency of S-phase cells than C-group. This effect was higher than cells just PHA-exposed, that is a natural antigen used to trigger *in vitro* macrophage inflammatory activation. OLZ-exposure also increased frequency of G2/M cells than C-group, whereas



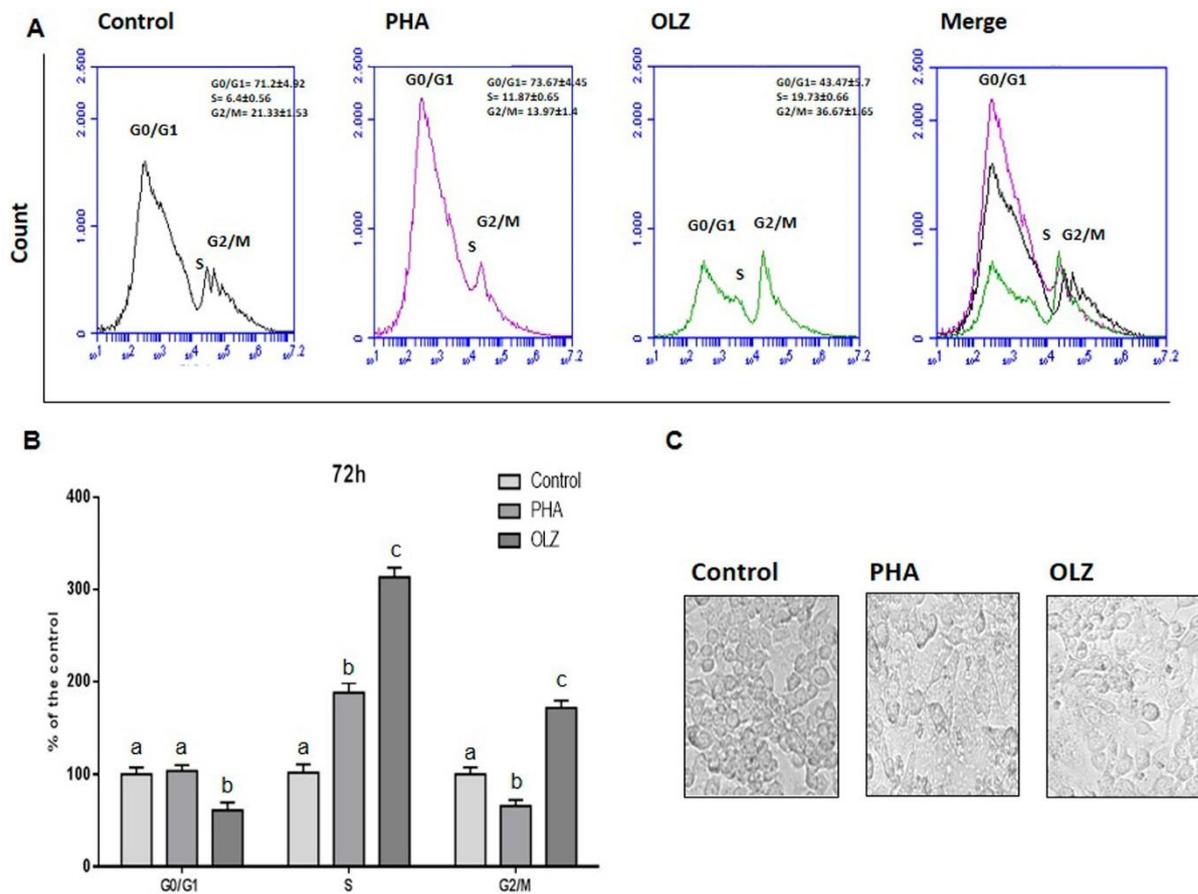
**Fig 1. Effect on RAW macrophages cellular proliferation in 72 h cultures e cellular of OLZ (OLZ) at different concentrations.** C = non-treated cells; PHA = cells activated by phytohemagglutinin antigen exposure. Treatments were compared using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Tukey *post hoc* test. Different letters (i.e., A, B, C, D, E, F) indicated significant statistical differences among treatments at  $p < 0.05$ . Treatments with A letter were considered with values similar to C group.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209223.g001>

cells PHA-exposed presented significant lower frequency of cells in this phase than C-group. Both, PHA and OLZ caused macrophage spreading pattern in monolayer cultures that indicate an inflammatory state.

Further, RAW cells were concomitantly exposed with OLZ at this concentration and Li at 0.7 mEq/L concentration, an anti-inflammatory drug (Fig 2A). All treatments increased cellular proliferation compared to the control group and proliferation was highest in cells exposed to OLZ plus Li. Modulation of oxidative markers that are involved with inflammatory processes were also evaluated (Fig 2B). All treatments increased SA and ROS levels than C group. However, this effect was more pronounced in cells just OLZ- treated. Therefore, it seems that Li attenuated OLZ oxidative effects on macrophage cells. Just cells OLZ-exposed presented higher NO levels than C group, including cells concomitantly OLZ and Li-treated.

Analysis of gene and protein expression of four inflammatory cytokine markers among treatments was also performed and results are presented in Fig 3. Cells just OLZ treated presented higher protein levels of IL- $\beta$ , IL-6 and TNF $\alpha$  proinflammatory cytokines (Fig 4). On the



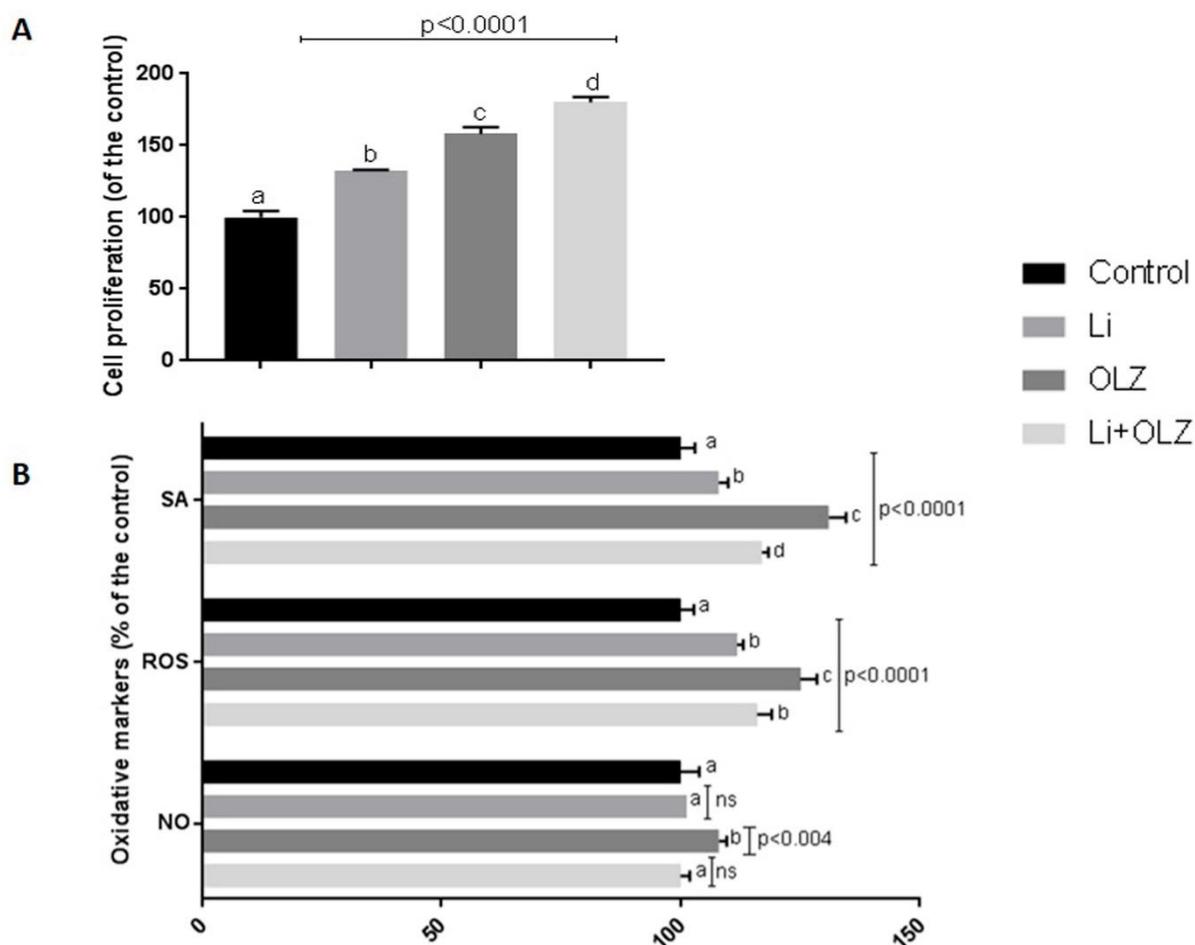
**Fig 2. Comparison of cell cycle determined by flow cytometry analysis among RAW macrophages 72 h cultures exposed OLZ (OLZ) at 0.03 µg/mL concentration and to phytohaemagglutinin (PHA), an natural antigen that trigger inflammatory macrophages activation.** (A) Representative graphics with cell phases: (G0/G1 = gap 1; S = synthesis; G2/M = gap2 and mitosis). (B) % of cells the control in at each stage (G0/G1 = gap 1; S = synthesis; G2/M = gap2 and mitosis) of the cell cycle compared by One-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Tukey *post hoc* test. The different letters (i.e., A, B, C, D, E, F) indicate statistical differences in each treatment at  $p < 0.05$ . (C) Monolayer culture pattern of RAW macrophages microscopic optic analysis ( $\times 40$ , scale bar = 20 µm) in control (C) cells and cells exposed to OLZ and PHA. No-activated C-cells presented higher frequency of spheric cells typical of monocytes. Cells PHA and OLZ exposed presenting a macrophage spreading pattern that is observed in inflammatory-activated cells.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209223.g002>

other hand, cells on this treatment presented lower levels of IL-10, an anti-inflammatory cytokine. OLZ induced gene overexpression of IL- $\beta$ , IL-6 and IL-10 cytokines. Therefore, the role of results indicated OLZ proinflammatory effect on RAW cells.

At contrary, cells just Li-exposed presented similar levels of IL-6, TNF- $\alpha$  and IL-10 cytokines than C non-activated macrophages group. However, a slight, but significant increase of IL- $\beta$  was observed in cells just Li-exposed t than C-group. Despite these results, IL- $\beta$ , as well as TNF- $\alpha$  gene expression were downregulated by Li-exposure. Both IL-6 and IL-10 genes were overexpressed in cells just Li-exposed.

Interaction between OLZ and Li showed a decrease on IL- $\beta$ , IL-6 and TNF $\alpha$  protein levels than cells just OLZ-exposed. However, levels of these cytokines were still significantly higher



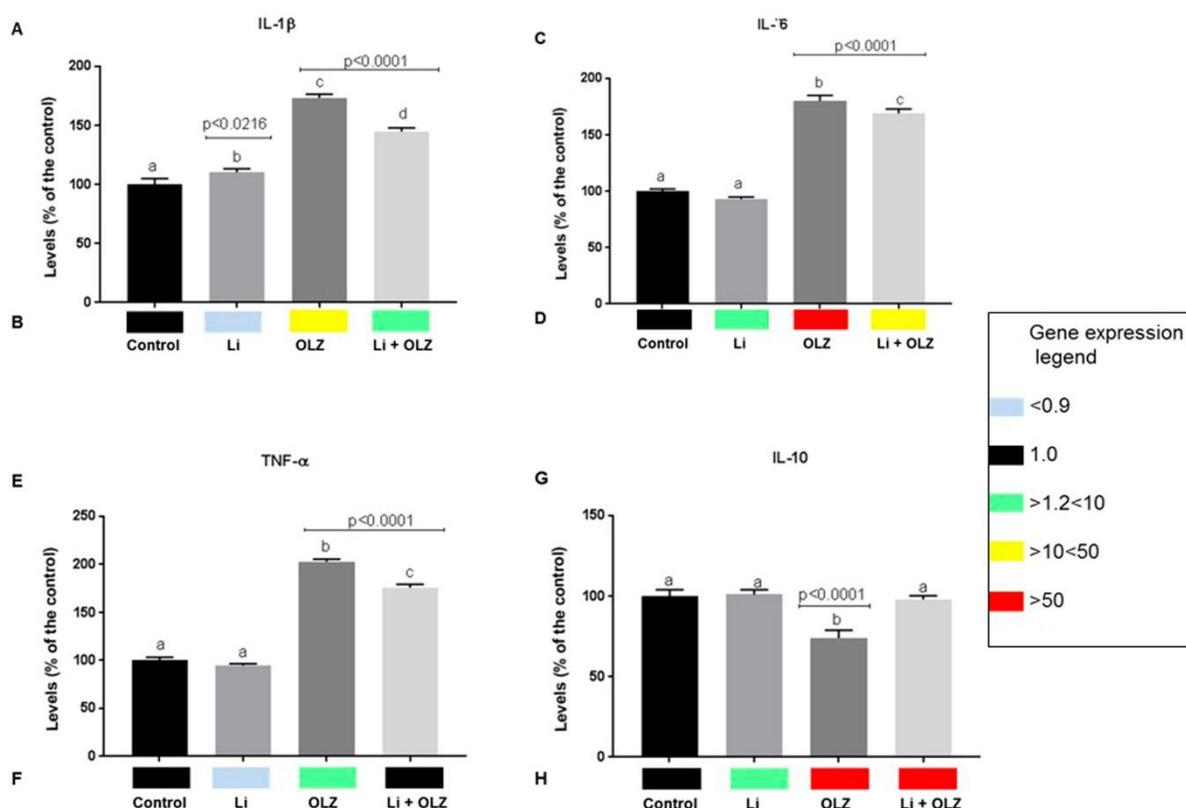
**Fig 3.** Interaction between OLZ (0.03  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and Li (0.7  $\text{mEq}/\text{L}$ ) on proliferation (A) and modulation of oxidative markers superoxide anion (SA), reactive oxygen species (ROS), and nitric oxide (NO) (B). Treatments were compared by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Tukey post hoc test. The different letters (i.e., A, B, C, D) indicate statistical differences in each treatment at  $p < 0.05$ . Treatments identified with A-letter were statistically similar to untreated-cells group (C)

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209223.g003>

than C-group. Despite, IL- $\beta$  and IL-6 genes to be overexpressed in cells concomitantly OLZ and Li exposed, this effect was more attenuated in comparison with cells just OLZ-exposed. In the presence Li, cells OLZ exposed presented similar TNF $\alpha$  gene expression than control group. IL-10 gene was also overexpressed in this treatment than C-group.

## Discussion

The present *in vitro* study evaluated the potential anti-inflammatory action of Li on proinflammatory response in macrophage cells triggered by the antipsychotic drug OLZ. The results suggest that Li may partially reverse the inflammatory response caused by OLZ on macrophage



**Fig 4. Modulation of protein and gene expression cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ , IL-10) involved with inflammatory response of RAW macrophages exposed to OLZ (OLZ, 0.03  $\mu$ g/mL) and Li (Li, and 0.7 mEq/L).** Treatments were compared by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Tukey post hoc test. The different letters (i.e., A, B, C, D) indicate statistical differences in each treatment at  $p < 0.05$ . Treatments with A letter were considered with values similar to C untreated-cells group. Gene expression of each cytokine in each treatment is represented by colored squares (black = gene expression similar to C-group; green square = gene overexpression  $\geq 1.2 < 10$  times than C-group; yellow square = gene overexpression  $\geq 10 < 50$  times than C-group; red square = gene overexpression  $\geq 50$  times than C-group). The beta-actin housekeeping was used as internal control to normalized gene expression analysis among treatments.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209223.g004>

cells. Based on these general results it is important to consider theoretical and methodological limitations.

In the first analysis performed here an OLZ curve-concentration showed a hormetic effect of this antipsychotic drug on macrophages. In fact, concentrations in to plasmatic therapeutic range of OLZ showed increase on macrophage proliferation, whereas concentrations  $> 1 \mu$ G/mL decreased significantly cellular proliferation than C-group. These results could indicate potential cytotoxic or immunosuppressive effect of OLZ on macrophages cells. Actually, previous studies reported potential apoptosis induction of OLZ on hamster pancreatic  $\beta$  cell line with marked apoptotic events on these cells. This action could explain potential pro-diabetic effect associate with OLZ administration [31]. Pessina et al [32] also described potential cytotoxic effect of high OLZ concentration on macrophages. However, main focus of the present study was clarifying potential interaction between OLZ and Li, that has some anti-inflammatory properties. For this reason, complementary analysis involving analysis of OLZ on

apoptosis modulation was not performed here. Perhaps, complementary studies about this issue could be performed, since some recent investigations, such as performed by Sanomachi et al [33] have described potential beneficial OLZ effect on cancer patients by down-regulation of survivin, which has been implicated in multidrug chemoresistance and apoptosis induction.

Investigations of OLZ effects on inflammatory modulation are relatively incipient. In RAW 264.7 macrophage cells we found a potential important hormetic effect on inflammatory response observed by cellular proliferation rates (Fig 1). This hormetic OLZ effect could explain differences between results found here and other studies published recently in the literature, such as performed by Stapel et al [34]. These authors showed that when human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) obtained from healthy adults were *in vitro* exposed to  $10^{-4}$  M OLZ occurred decreasing in mRNA and protein levels of IL-1 $\beta$ , IL-6, and TNF- $\alpha$  than control group, at 72 h cell cultures. However, the OLZ concentration (31.24  $\mu$ g/mL) used by authors was thousand times greater than concentration tested here (0.03  $\mu$ g/mL), that is into therapeutic plasmatic OLZ concentration range [24]. In fact, we think that in an *in vitro* protocol the use of OLZ at a plasmatic therapeutic concentration could be more realistic considering pharmacokinetics of this drug. Into the body, OLZ is metabolized by cytochrome P450 and more than 40% of the oral doses is removed by the hepatic first-pass effect. In these terms, it is not expected that high OLZ concentrations arrive in peripheral body cells including macrophages.

Previous evidence suggested that immune system alteration associated with OLZ treatment may contribute to antipsychotic-induced weight gain [35]. Inflammatory effects of OLZ have not been well-characterized. However, in light of recent findings that OLZ may induce inflammatory signaling, it is possible that concomitant use of OLZ with anti-inflammatory drugs may attenuate proinflammatory effects of OLZ. In psychiatric practice use of Li, which exerts anti-inflammatory effects via inhibitor of GSK-3, is common [36].

Studies examining the beneficial effects of Li in combination with OLZ may help to understand the increase in efficacy of treatment of some psychiatric symptoms conferred by combination therapies. Clinical studies have demonstrated that concomitant treatment with OLZ and Li reduced rehospitalization risk after a manic episode [20,37]. Moreover, previous studies have shown that coadministration of melatonin with OLZ and Li in adolescents with Bipolar Disorder may reduce weight gain associated with OLZ treatment [38]. The beneficial effects of coadministration demonstrated in these studies provided justification for our evaluation of effects of OLZ and Li on oxidative and inflammatory metabolism.

Evaluation of *in vitro* interactions of OLZ and Li was carried out by treatment of cells at concentrations in the recommended therapeutic plasma range. The range evaluated for OLZ was 0.02  $\mu$ g/mL to 0.08  $\mu$ g/mL according to guidelines of drug therapeutic monitoring [39]. The therapeutic Li concentration used was 0.07 mEq/L, which has been previously evaluated *in vitro* [21,22]. Therefore, results of this study may be representative of interactive *in vivo* effects between OLZ and Li.

Previous studies have consistently supported the hypothesis that oxi-inflammatory effects of OLZ administration are associated with metabolic side effects [13,16,18]. In addition, anti-inflammatory properties of Li are also well-characterized and seem to contribute to reduction in frequency of manic episodes in bipolar patients [35,40]. However, potential effects of interaction between OLZ and Li on metabolic side effects are not clear. For example, the study performed by Katagiri et al. [41] suggested no direct impact of Li treatment on OLZ side effects. In contrast, we demonstrated that cotreatment with OLZ and Li resulted in decreased proinflammatory cytokines and increased of levels of IL-10, an anti-inflammatory cytokine.

Our results are placed in appropriate context by considering functional aspects of macrophages in relation to inflammatory response. Macrophages present two distinct phenotypic

subtypes: classically and alternatively activated macrophages. Classically activated, or M1, macrophages are pro-inflammatory and polarized by antigens such as lipopolysaccharide (LPS) and PHA, resulting in production of pro-inflammatory cytokines such as interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-6, IL-12, IL-23, and TNF- $\alpha$ . Conversely, alternatively activated, or M2, macrophages are anti-inflammatory and immunoregulatory cells polarized by Th2 cytokines such as IL-4 and IL-13. M2 cells also produce anti-inflammatory cytokines such as IL-10 and TGF- $\beta$ . The role of M1/M2 macrophage polarization balance in organ response to inflammation or injury has been well-established [42].

When inflammation is triggered macrophages first exhibit the M1 phenotype, releasing mainly IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , and IL-12 in response. As the M1 phase continues, damage may occur. Higher levels of proinflammatory cytokines indicate a more intense inflammatory response by M1 macrophages. Conversion to the M2 phenotype associated with increased release of anti-inflammatory cytokines such as IL-10 is crucial in resolution of the proinflammatory state. M2 macrophages are able to suppress inflammation, contributing to tissue repair, remodeling, vasculogenesis, and maintenance of homeostasis [42].

Activated macrophages cultured for 72 h exposed to a single antigen were expected to produce higher levels of proinflammatory cytokines. However, we also observed increased anti-inflammatory cytokines. Anti-inflammatory cytokines produced by activated macrophages may influence macrophage inflammatory response in three ways: (1) M1 phenotype suppression in the presence of an antigen molecule; (2) decreased production of proinflammatory cytokines; (3) faster conversion from M1 to M2 phenotype [42].

As cytokine protein and gene expression are the best markers for determination of macrophage polarization, our results showed that M1 polarization of RAW 264.7 macrophages were greatly attenuated by Li treatment, as levels of most cytokines remained similar to the untreated group. In contrast, clear M1 polarization was observed in OLZ-treated macrophages, and this inflammatory response was partially attenuated by administration of Li. These results support the hypothesis that Li may attenuate the inflammatory cascade triggered by the antipsychotic drug OLZ.

Of note, macrophages treated with only Li showed greater cellular proliferation and slightly higher IL-1 $\beta$  levels than control. Based on previous studies, slight macrophage activation may occur in response to Li because the RAW 264.7 macrophage cell line is very sensitive to chemical changes in culture medium [43]. Therefore, these results may represent a limitation of this *in vitro* model rather than a true effect of Li on macrophage activation.

Our results also showed an effect of cotreatment with Li and OLZ on oxidative metabolism markers associated with the inflammatory process. Cells exposed only to OLZ produced higher levels of superoxide, ROS, and NO. However, Li attenuated levels OLZ-induced oxidative markers. Of particular interest is the effect of OLZ treatment on NO levels, as NO is an important pleiotropic signaling molecule. NO induces concentration-dependent enhancement of endothelial cell proliferation, angiogenesis, and acceleration of wound healing. Conversely, NO is an oxidative molecule, and may also contribute to induce inflammation [44].

In addition to increased production of pro-inflammatory cytokines, M1 macrophages produce increased NO via inducible nitric oxide synthase (iNOS) [44]. In contrast, M2 macrophages are characterized by expression of the enzyme arginase, which hydrolyzes arginine to ornithine and urea. This reaction limits arginine availability for NO synthesis [45]. Therefore, analysis of NO levels may indicate phenotype of macrophage cells. Cotreatment with OLZ and Li significantly decreased NO levels, supporting the hypothesis that Li may attenuate the proinflammatory effect triggered by OLZ.

Decreased ROS levels in macrophages in response to cotreatment with OLZ and Li highlights the benefit of this interaction on the inflammatory pathway since accumulating evidence

supports the hypothesis that redox signaling plays a role in macrophage polarization [46]. Moreover, elevation of ROS by OLZ results from changes in mitochondrial functioning suggesting that Li may act on mitochondria. However, this presumption is still speculative since we did not perform direct assays of potential mitochondrial dysfunction triggered by OLZ exposure. Despite this methodological limitation, it is important to point out that some previous studies have suggested that antipsychotic effects on metabolism may be associated with alteration of mitochondrial function. This alteration, associated with a chronic inflammatory state, may contribute to development of metabolic syndrome in patients that use antipsychotic drugs [47, 48].

This presumption is corroborated by a recent study performed by Scani et al [49] using peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from schizophrenic patients exposed to antipsychotic drugs. Results from this study showed that these drugs may induce mitochondrial dysfunction. Mitochondria are key organelles responsible for energy production and control many processes from signaling to cell death. The function of the mitochondrial electron transport chain is coupled with production of ROS in the form of superoxide anion and hydrogen peroxide. Mitochondrial ROS overproduction and changes in mitochondrial redox homeostasis are involved in a number of neurological and somatic conditions [50].

As OLZ treatment of macrophages increased superoxide and ROS, which includes hydrogen peroxide, these results indirectly suggest that this drug may cause mitochondrial dysfunction. Attenuation of ROS production by Li exposure may be possible as described in an investigation performed by Kim et al [51]. This study demonstrated that mitochondrial dysfunction and lipid peroxidation in rat frontal cortex triggered by chronic NMDA administration was partially reversed by Li treatment. In humans, Souza et al [52] showed that BD patients treated for six weeks with Li had reduced mitochondrial dysfunction in Complex 1 of the electron transport chain.

Despite limitations and constraints related to *in vitro* studies, our results highlight potential for use of Li as an additional therapeutic approach in the prevention of oxidative and inflammatory effects triggered by OLZ. However, further studies are needed to clarify the mechanisms involved in the protective effect of Li on OLZ-induced inflammatory response and the impact Li may have on the prevention of metabolic syndrome in patients treated with second generation antipsychotics drugs.

## Conclusion

Concomitant *in vitro* macrophage exposure to OLZ and Li suggests that Li may attenuate oxidation and inflammation. It can be inferred that concomitant use of OLZ may contribute to attenuation of some side effects triggered by OLZ administration.

## Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge “Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq),” “Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)” and “Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM)” for Brazilian financial support (grants and fellowships).

## Author Contributions

**Conceptualization:** Marcelo Soares Fernandes, Fernanda Barbisan, Verônica Farina Azzolin, Pedro Antônio Schmidt do Prado-Lima, Cibele Ferreira Teixeira, Ivo Emílio da Cruz Jung, Ednea Maia Aguiar- Ribeiro, Ivana Beatrice Mânica da Cruz.

**Data curation:** Marcelo Soares Fernandes, Fernanda Barbisan, Ivana Beatrice Mânica da Cruz.

**Formal analysis:** Marcelo Soares Fernandes, Fernanda Barbisan, Ivana Beatrice Mânica da Cruz.

**Funding acquisition:** Ednea Maia Aguiar- Ribeiro.

**Investigation:** Marcelo Soares Fernandes, Fernanda Barbisan, Verônica Farina Azzolin, Pedro Antônio Schmidt do Prado-Lima, Cibele Ferreira Teixeira, Ivo Emílio da Cruz Jung, Charles Elias Assmann, Rogerio Tomasi Riffel, Marta Maria Medeiros Frescura Duarte, Ivana Beatrice Mânica da Cruz.

**Methodology:** Marcelo Soares Fernandes, Fernanda Barbisan, Verônica Farina Azzolin, Cibele Ferreira Teixeira, Ivo Emílio da Cruz Jung, Charles Elias Assmann, Marta Maria Medeiros Frescura Duarte, Ivana Beatrice Mânica da Cruz.

**Resources:** Marcelo Soares Fernandes, Fernanda Barbisan, Ivana Beatrice Mânica da Cruz.

**Supervision:** Rogerio Tomasi Riffel.

**Validation:** Marcelo Soares Fernandes, Fernanda Barbisan, Verônica Farina Azzolin, Pedro Antônio Schmidt do Prado-Lima, Cibele Ferreira Teixeira, Ivo Emílio da Cruz Jung, Ivana Beatrice Mânica da Cruz.

**Writing – original draft:** Marcelo Soares Fernandes, Fernanda Barbisan, Pedro Antônio Schmidt do Prado-Lima, Ivana Beatrice Mânica da Cruz.

**Writing – review & editing:** Ivana Beatrice Mânica da Cruz.

## References

1. Komossa K, Rummel-Kluge C, Hunger H, Schwarz S, Bhoopathi PS, Kissling W, et al. Ziprasidone versus other atypical antipsychotics for schizophrenia. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2009. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD006654.pub2>
2. Verdolini N, Hidalgo-Mazzei D, Murru A, Pacchiarotti I, Samalin L, Young AH, et al. Mixed states in bipolar and major depressive disorders: systematic review and quality appraisal of guidelines. *Acta Psychiatr Scand*. 2018; 138:196–222. <https://doi.org/10.1111/acps.12896> PMID: 29756288
3. Lindström L, Lindström E, Nilsson M, Höistad M Maintenance therapy with second generation antipsychotics for bipolar disorder—A systematic review and meta-analysis. *J Affect Disord*. 2017; 213:138–150. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2017.02.012> PMID: 28222360
4. Farlow MR, Shamliyan TA. Benefits and harms of atypical antipsychotics for agitation in adults with dementia. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2017; 27:217–231. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2017.01.002> PMID: 28111239
5. Dale M, van Duijn E. Anxiety in Huntington's Disease. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*. 2015; 27:262–71. <https://doi.org/10.1176/appi.neuropsych.14100265> PMID: 25803201
6. Spertus J, Horvitz-Lennon M, Abing H, Normand SL. Risk of weight gain for specific antipsychotic drugs: a meta-analysis. *NPJ Schizophr*. 2018; 4:12. <https://doi.org/10.1038/s41537-018-0053-9> PMID: 29950586
7. Flank J, Schechter T, Gibson P, Johnston DL, Orsey AD, Portwine C, et al. Olanzapine for prevention of chemotherapy-induced nausea and vomiting in children and adolescents: a multi-center, feasibility study. *Support Care Cancer*. 2018; 26:549–555. <https://doi.org/10.1007/s00520-017-3864-8> PMID: 28856448
8. Yooder J, Permsuwan U, Nimworapan M. Efficacy and safety of olanzapine for the prevention of chemotherapy-induced nausea and vomiting: A systematic review and meta-analysis. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2017; 112:113–125. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2017.02.017> PMID: 28325253
9. Fernø J, Ersland KM, Duus IH, González-García I, Fossan KO, Berge RK, Steen VM, Skrede S. Olanzapine depot exposure in male rats: Dose-dependent lipogenic effects without concomitant weight gain. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2015; 25:923–32. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2015.03.002> PMID: 25823694

10. Rojo LE, Gaspar PA, Silva H, Risco L, Arena P, Cubillos-Robles K, Jara B. Metabolic syndrome and obesity among users of second generation antipsychotics: A global challenge for modern psychopharmacology. *Pharmacol Res.* 2015; 101:74–85. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2015.07.022> PMID: 26218604
11. Cildir G, Akincilar SC, Tergaonkar V. Chronic adipose tissue inflammation: all immune cells on the stage. *Trends Mol Med.* 2013; 19:487–500. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2013.05.001> PMID: 23746697
12. Victoriano M, de Beaurepaire R, Naour N, Guerre-Millo M, Quignard-Boulangé A, Huneau JF, Mathé V, Tomé D, Hermier D. Olanzapine-induced accumulation of adipose tissue is associated with an inflammatory state. *Brain Res.* 2010; 1350:167–75. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.05.060> PMID: 20570665
13. Sárvári AK, Veréb Z, Uray IP, Fésüs L, Balajthy Z. Atypical antipsychotics induce both proinflammatory and adipogenic gene expression in human adipocytes in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014; 450:1383–9. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.07.005> PMID: 25019983
14. Davey KJ, O'Mahony SM, Schellekens H, O'Sullivan O, Bienenstock J, Cotter PD, Dinan TG, Cryan JF. Gender-dependent consequences of chronic olanzapine in the rat: effects on body weight, inflammatory, metabolic and microbiota parameters. *Psychopharmacology (Berl).* 2012; 221:155–69. <https://doi.org/10.1007/s00213-011-2555-2> PMID: 22234378
15. Zhang Q, He M, Deng C, Wang H, Huang XF. Effects of olanzapine on the elevation of macrophage infiltration and pro-inflammatory cytokine expression in female rats. *J Psychopharmacol.* 2014; 28:1161–9. <https://doi.org/10.1177/0269881114555250> PMID: 25336715
16. Calevro A, Cotel MC, Natesan S, Modo M, Vernon AC, Mondelli V. Effects of chronic antipsychotic drug exposure on the expression of Translocator Protein and inflammatory markers in rat adipose tissue. *Psychoneuroendocrinology.* 2018; 95: 28–33. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2018.05.021> PMID: 29793094
17. Cui D, Peng Y, Zhang C, Li Z, Su Y, Qi Y, Xing M, Li J, Kim GE, Su KN, Xu J, Wang M, Ding W, Piecychna M, Leng L, Hirasawa M, Jiang K, Young L, Xu Y, Qi D, Bucala R. Macrophage migration inhibitory factor mediates metabolic dysfunction induced by atypical antipsychotic therapy. *J Clin Invest.* 2018; 128:4997–5007. <https://doi.org/10.1172/JCI93090> PMID: 30295645
18. Jeon SW, Kim YK. Unresolved Issues for Utilization of Atypical Antipsychotics in Schizophrenia: Anti-psychotic Polypharmacy and Metabolic Syndrome. *Int J Mol Sci.* 2017; 18. pii: E2174. <https://doi.org/10.3390/ijms18102174> PMID: 29057817
19. Finley PR. Drug Interactions with Lithium: An Update. *Clin Pharmacokinet.* 2016; 55:925–41. <https://doi.org/10.1007/s40262-016-0370-y> PMID: 26936045
20. Atkin T, Nuñez N, Gobbi G. Practitioner Review: The effects of atypical antipsychotics and mood stabilisers in the treatment of depressive symptoms in paediatric bipolar disorder. *J Child Psychol Psychiatry.* 2017; 58:865–879. <https://doi.org/10.1111/jcpp.12735> PMID: 28474733
21. Barbisan F, Azzolin VF, Teixeira CF, Mastella MH, Ribeiro EE, do Prado-Lima PAS, et al. Xanthine-Catechin Mixture Enhances Lithium-Induced Anti-Inflammatory Response in Activated Macrophages In Vitro. *Biomed Res Int.* 2017; 2017:4151594. <https://doi.org/10.1155/2017/4151594> PMID: 29250539
22. Barbisan F, Azzolin VF, Monteiro GC, Teixeira CF, Mastella MH, Bueno V, Duarte MMMF, Wagner G, do Prado-Lima PAS, Ribeiro EE, da Cruz IBM. Genetic or pharmacological superoxide-hydrogen peroxide imbalances modulate the in vitro effects of lithium on glycogen synthase kinase-3 $\beta$ . *Gene.* 2018; 655:48–55. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.02.046> PMID: 29466765
23. Duarte T, Barbisan F, do Prado-Lima PAS, Azzolin VF, da Cruz Jung IE, Duarte MMMF, Teixeira CF, Mastella MH, da Cruz IBM. Ziprasidone, a second-generation antipsychotic drug, triggers a macrophage inflammatory response in vitro. *Cytokine.* 2018; 106:101–107. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2017.10.017> PMID: 29103822
24. Mauri MC, Paletta S, Di Pace C, Reggiori A, Cirmigliaro G, Valli I, Altamura AC. Clinical Pharmacokinetics of Atypical Antipsychotics: An Update. *Clin Pharmacokinet.* 2018; <https://doi.org/10.1007/s40262-018-0664-3> PMID: 29915922
25. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983; 65: 55–63. PMID: 6606682
26. Azzolin VF, Cadoná FC, Machado AK, Berto MD, Barbisan F, Dornelles EB, et al. Superoxide-hydrogen peroxide imbalance interferes with colorectal cancer cells viability, proliferation and oxaliplatin response. *Toxicol Vitro.* 2016; 32: 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2015.12.001> PMID: 26674755
27. Morabito G, Trombetta D, Singh Brajendra K, Prasad Ashok K, Parmar Virinder S, Naccari C, Mancari F, Saija A, Cristani M, Firuzi O, Saso L. Antioxidant properties of 4-methylcoumarins in in vitro cell-free systems. *Biochimie.* 2010; 92:1101–7. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2010.04.017> PMID: 20433892

28. Costa F, Barbisan F, Assmann CE, Araújo NKF, de Oliveira AR, Signori JP, et al. Seminal cell-free DNA levels measured by PicoGreen fluorochrome are associated with sperm fertility criteria. *Zygote*. 2017; 25:111–119. <https://doi.org/10.1017/S0967199416000307> PMID: 28264730
29. da Cruz Jung IE, Machado AK, da Cruz IB, Barbisan F, Azzolin VF, Duarte T, Duarte MM, do Prado-Lima PA, Bochi GV, Scola G, Moresco RN. Haloperidol and Risperidone at high concentrations activate an in vitro inflammatory response of RAW 264.7 macrophage cells by induction of apoptosis and modification of cytokine levels. *Psychopharmacology (Berl)*. 2016; 233:1715–23. <https://doi.org/10.1007/s00213-015-4079-7> PMID: 26391290
30. Pamies A, Bal-Price A, Simeonov D, Tagle D, Allen D, Gerhold D, et al. Good cell culture practice for stem cells & stem-cell-derived models. *ALTEX*. 2018; 35:353–378. <https://doi.org/10.14573/altex.1710081>
31. Ozasa R, Okada T, Nadanaka S, Nagamine T, Zyryanova A, Harding H et al. The antipsychotic olanzapine induces apoptosis in insulin-secreting pancreatic  $\beta$  cells by blocking PERK-mediated translational attenuation. *Cell Struct Funct*. 2013; 38:183–95. [doi.org/10.1247/csf.13012](https://doi.org/10.1247/csf.13012) PMID: 23812432
32. Pessina A, Turlizzi E, Bonomi A, Guizzardi F, Cavicchini L, Croera C et al. In vitro toxicity of clozapine, olanzapine, and quetiapine on granulocyte-macrophage progenitors (GM-CFU). *Pharmacopsychiatry*. 2006 Jan; 39(1):20–2. Erratum in: *Pharmacopsychiatry*. 2006; 39:160. <https://doi.org/10.1055/s-2006-931475> PMID: 16453250
33. Sanomachi T, Suzuki S, Kuramoto K, Takeda H, Sakaki H, Togashi K et al. Olanzapine, an Atypical Antipsychotic, Inhibits Survivin Expression and Sensitizes Cancer Cells to Chemotherapeutic Agents. *Anticancer Res*. 2017 Nov; 37(11):6177–6188. <https://doi.org/10.21873/anticancer.12067> PMID: 29061799
34. Stapel B, Sieve I, Falk CS, Bleich S, Hilfiker-Kleiner D, Kahl KG. Second generation atypical antipsychotics olanzapine and aripiprazole reduce expression and secretion of inflammatory cytokines in human immune cells. *J Psychiatr Res*. 2018; 105:95–102. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2018.08.017> PMID: 30216787
35. Fonseka TM, Müller DJ, Kennedy SH. Inflammatory Cytokines and Antipsychotic-Induced Weight Gain: Review and Clinical Implications. *Mol Neuropsychiatry*. 2016; 2:1–14. <https://doi.org/10.1159/000441521> PMID: 27606316
36. Beurel E, Grieco SF, Jope RS. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): regulation, actions, and diseases. *Pharmacol Ther*. 2015; 148:114–31. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.11.016> PMID: 25435019
37. Wingård L, Bodén R, Brandt L, Tiihonen J, Tanskanen A, Kieler H et al. Reducing the rehospitalization risk after a manic episode: A population based cohort study of lithium, valproate, olanzapine, quetiapine and aripiprazole in monotherapy and combinations. *J Affect Disord*. 2017; 217:16–23. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2017.03.054> Epub 2017 Mar 27. PMID: 28364619
38. Mostafavi SA, Solhi M, Mohammadi MR, Akhondzadeh S. Melatonin for Reducing Weight Gain Following Administration of Atypical Antipsychotic Olanzapine for Adolescents with Bipolar Disorder: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *J Child Adolesc Psychopharmacol*. 2017; 27:440–444. <https://doi.org/10.1089/cap.2016.0046> PMID: 28339282
39. Mauri MC, Paletta S, Di Pace C, Reggiori A, Cirnigliaro G, Valli I, Altamura AC. Clinical Pharmacokinetics of Atypical Antipsychotics: An Update. *Clin Pharmacokinet*. 2018. <https://doi.org/10.1007/s40262-018-0664-3> PMID: 29915922
40. Machado-Vieira R. Lithium, Stress, and Resilience in Bipolar Disorder: Deciphering this key homeostatic synaptic plasticity regulator. *J Affect Disord*. 2018; 233:92–99. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2017.12.026> PMID: 29310970
41. Katagiri H, Takita Y, Tohen M, Higuchi T, Kanba S, Takahashi M. Safety and efficacy of olanzapine monotherapy and olanzapine with a mood stabilizer in 18-week treatment of manic/mixed episodes for Japanese patients with bipolar I disorder. *Curr Med Res Opin*. 2012; 28:701–13. <https://doi.org/10.1185/03007995.2012.666961> PMID: 22356118
42. Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, Taghadosi M, Esmaili SA, Mardani F, et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J Cell Physiol*. 2018; 233:6425–6440. <https://doi.org/10.1002/jcp.26429> PMID: 29319160
43. Berghaus LJ, Moore JN, Hurley DJ, Vandenplas ML, Fortes BP, Wolfert MA, et al. Innate immune responses of primary murine macrophage-lineage cells and RAW 264.7 cells to ligands of Toll-like receptors 2, 3, and 4. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2010; 33:443–54. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2009.07.001> PMID: 19732955
44. Rath M, Müller I, Kropf P, Closs EI, Munder M. Metabolism via Arginase or Nitric Oxide Synthase: Two Competing Arginine Pathways in Macrophages. *Front Immunol*. 2014; 5:532. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00532> PMID: 25386178

45. Juhas U, Ryba-Stanislawowska M, Szargiej P, Myśliwska J. Different pathways of macrophage activation and polarization. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2015; 69:496–502. <https://doi.org/10.5604/17322693.1150133> PMID: 25983288
46. Tan HY, Wang N, Li S, Hong M, Wang X, Feng Y. The Reactive Oxygen Species in Macrophage Polarization: Reflecting Its Dual Role in Progression and Treatment of Human Diseases. *Oxid Med Cell Longev*. 2016; 2016:2795090. <https://doi.org/10.1155/2016/2795090> PMID: 27143992
47. Baig MR, Navaira E, Escamilla MA, Raventos H, Walss-Bass C. Clozapine treatment causes oxidation of proteins involved in energy metabolism in lymphoblastoid cells: a possible mechanism for antipsychotic-induced metabolic alterations. *J Psychiatr Pract*. 2010; 16:325–33. <https://doi.org/10.1097/01.pra.0000388627.36781.6a> PMID: 20859109
48. Contreras-Shannon V1, Heart DL, Paredes RM, Navaira E, Catano G, Maffi SK, Walss-Bass C. Clozapine-induced mitochondria alterations and inflammation in brain and insulin-responsive cells. *PLoS One*. 2013; 8:e59012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059012> PMID: 23527073
49. Scaini G, Quevedo J, Velligan D, Roberts DL, Raventos H, Walss-Bass C. Second generation antipsychotic-induced mitochondrial alterations: Implications for increased risk of metabolic syndrome in patients with schizophrenia. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2018 28(3): 369–380. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2018.01.004> PMID: 29449054
50. Angelova PR, Abramov AY. Role of mitochondrial ROS in the brain: from physiology to neurodegeneration. *FEBS Lett*. 2018; 592:692–702. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12964> PMID: 29292494
51. Kim HK, Isaacs-Trepanier C, Elmi N, Rapoport SI, Andreazza AC. Mitochondrial dysfunction and lipid peroxidation in rat frontal cortex by chronic NMDA administration can be partially prevented by lithium treatment. *J Psychiatr Res*. 2016; 76:59–65. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2016.02.001> PMID: 26894301
52. de Sousa RT, Streck EL, Zanetti MV, Ferreira GK, Diniz BS, Brunoni AR, et al. Lithium increases leukocyte mitochondrial complex I activity in bipolar disorder during depressive episodes. *Psychopharmacology (Berl)*. 2015; 232:245–50. <https://doi.org/10.1007/s00213-014-3655-6> PMID: 24961563

## ANEXO B - COMPROVANTE DE SUBMISSÃO ARTIGO 2




[HOME](#) • [LOGOUT](#) • [HELP](#) • [REGISTER](#) • [UPDATE MY INFORMATION](#) • [JOURNAL OVERVIEW](#)  
[MAIN MENU](#) • [CONTACT US](#) • [SUBMIT A MANUSCRIPT](#) • [INSTRUCTIONS FOR AUTHORS](#)

Role: Author | Username: ivana.ufsm@gmail.com

**Submissions with Production Completed**

**Contents:** This page lists all submissions where production has been completed.

Page: 1 of 1 (1 total submissions)

Display  results per page.

Action	Manuscript Number	Article Title	Initial Date Submitted	Final Decision Date
▼	IVAN-D-18-00267	Acai (Euterpe oleracea Mart.) modulates in vitro pro-inflammatory response induced by olanzapine, an antipsychotic drug	16 Nov 2018	

Page: 1 of 1 (1 total submissions)

Display  results per page.

[<< Author Main Menu](#)