

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

Thiago Duarte

**INFLUÊNCIA DO POLIMORFISMO GENÉTICO VAL16ALA-SOD2 E
DA MATRIZ QUÍMICA DO GUARANÁ NO ESTADO OXIDATIVO-
INFLAMATÓRIO IN VITRO DO CLORIDRATO DE ZIPRASIDONA**

Santa Maria, RS, Brasil

2019

Thiago Duarte

INFLUÊNCIA DO POLIMORFISMO GENÉTICO VAL16ALA-SOD2 E DA MATRIZ
QUÍMICA DO GUARANÁ NO ESTADO OXIDATIVO-INFLAMATÓRIO IN VITRO DO
CLORIDRATO DE ZIPRASIDONA

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ivana Beatrice Mânica da Cruz

Santa Maria, RS, Brasil

2019

Duarte, Thiago
INFLUÊNCIA DO POLIMORFISMO GENÉTICO VAL16ALA-SOD2 E DA
MATRIZ QUÍMICA DO GUARANÁ NO ESTADO OXIDATIVO
INFLAMATÓRIO IN VITRO DO CLORIDRATO DE ZIPRASIDONA /
Thiago Duarte.- 2019.
182 p.; 30 cm

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

1. Esquizofrenia 2. Polimorfismo Val16Ala-SOD2 3.
Ziprasidona 4. Inflamação 5. Estresse Oxidativo I. Mânica
da Cruz, Ivana Beatrice II. Título.

Thiago Duarte

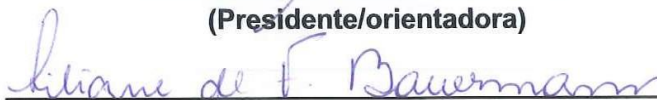
**INFLUÊNCIA DO POLIMORFISMO GENÉTICO VAL16ALA-SOD2 E DA
MATRIZ QUÍMICA DO GUARANÁ NO ESTADO OXIDATIVO-
INFLAMATÓRIO IN VITRO DO CLORIDRATO DE ZIPRASIDONA**

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

Aprovada em 12 de Março de 2019



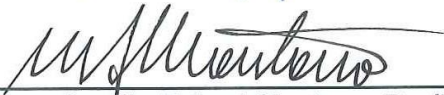
**Ivana Beatrice Mânica da Cruz, Dr^a.
(Presidente/orientadora)**



Liliane de Freitas Bauermann, Dr^a. (UFSM)



Cláudia Giuliano Bica, Dr^a. (UFCSPA)



Marco Aurélio Echart Montano, Dr. (UNOESC)



Luiz Fernando Freire Royes, Dr. (UFSM)

Santa Maria, RS, Brasil

2019

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Paulo Antônio Silva Duarte e Marta Maria Medeiros Frescura Duarte por todo o apoio, auxílio, amor, carinho e dedicação durante o meu crescimento e criação sem pedirem nada em troca.

A Prof. Dra. Ivana Beatrice Mânica da Cruz por seu gesto grandioso de ter me aberto as portas do Laboratório Biogenômica em Outubro de 2012 como “porta da esperança”, me acolhendo como seu orientado e me prestando seus inestimáveis conselhos, sua disponibilidade, atenção, carinho e auxílio durante toda a minha trajetória como pós graduando desde o mestrado até os dias atuais transformando-se em minha “mãe científica”. És um exemplo maravilhoso de profissionalismo e ser humano e certamente um espelho a ser constantemente seguido.

A Fernanda Barbisan pela importantíssima e indebitável contribuição que me deu o impulso necessário para atravessar as barreiras que se colocam diante da submissão e publicação dos artigos científicos que engessam o trabalho desta tese (especialmente em colaboração conjunta como autora principal no terceiro artigo publicado), assim como foi minha inspiração para a realização do meu crescimento acadêmico como pós graduando.

Aos colegas de laboratório Verônica Farina Azzolin, Moisés Henrique Mastella, Audrei Alves, Charles Elias Assmann, Grazielli Castagna, Marcelo Soares Fernandes e demais pesquisadores por todo o acompanhamento pessoal e científico no decorrer de todos esses anos, assim como todo e qualquer auxílio prestado em experimentos, trabalhos publicados, eventos organizados e momentos de descontração.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo imprescindível auxílio financeiro e de fomento à pesquisa através de suas bolsas de mestrado e doutorado que foram de suma importância para a realização de todas as minhas pesquisas.

Ao Programa de Pós Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Maria e a super secretária Zeli por sempre ser tão prestativa e auxiliar à todos os pós graduandos na resolução de problemas e sanando dúvidas.

Aos amigos Leonardo Souza Guilherme, Ricardo César do Amaral, Genésio Macedo Barão, Eduardo Stringini Severo, Bruno Marinho Trindade, Bruno dos Santos Lima, Guilherme Jaques Guastavino, Angelo Garcia Costa, Cássio Bordin Fabra, Lucas de Abreu Collares, Ricardo Lezard Fleck, Ricardo Nicoloso, Adriana Cristina Galis, Fernanda de Moraes Carnielutti, Luciana Minuzzi, entre tantos outros pelos momentos de alegria e diversão bem como nos momentos mais difíceis e necessários ao longo de minha vida.

Aos colegas e ex-colegas de banda dos Os Biitos e ALCOOLFALANTES : Rafael Martins Sangoi, Douglas Jamie Barcellos, Samuel Rios, Dirceu Rodrigues Athayde, Gabriel Villanova e Gilberto Oliveira por me acompanharem por todos esse anos no hobby e na realização pessoal de poder lidar com música nas horas vagas.

Aos meus anjos de luz José Manuel Rosa da Cruz (*in memoriam*) e Mirela Rosa da Cruz (*in memorian*) por terem sido meus vizinhos desde a infância e por terem me proporcionado momentos incríveis que jamais esquecerei. Dedico o caminho que trilho hoje em nome de vocês.

Aos amados avós Renato Nouals Duarte, Cora Silva Duarte, Antônio Fernandes Frescura e Maria de Lourdes Medeiros Frescura que não mais encontram-se neste plano, mas que fizeram de mim uma criança absurdamente feliz e que hoje, servem como motivação para que eu continue sempre trilhando o caminho de um ser humano bom e honesto.

A John Lennon, Paul McCartney, George Harrison e Ringo Starr por terem criado a trilha sonora da minha vida e que tanto me animou nas horas mais alegres quanto consolou nas horas mais tristes.

A Ayrton Senna da Silva por suas 41 vitórias, 80 pódios, 65 *pole positions*, 19 voltas mais rápidas e um legado inesquecível como piloto e ser humano através de suas doações para crianças carentes e por todo o trabalho que o instituto com o seu nome realiza para a educação e o futuro das crianças de nosso país. Obrigado por ter sido uma inspiração de garra, determinação, superação nas adversidades e o meu primeiro herói antes de qualquer Batman ou Homem Aranha.

*“Ser humilde com os superiores é
um dever; com os iguais, é uma cortesia;
com os inferiores, uma nobreza; e com todos,
segurança!”*

Bruce Lee

RESUMO

INFLUÊNCIA DO POLIMORFISMO GENÉTICO VAL16ALA-SOD2 E DA MATRIZ QUÍMICA DO GUARANÁ NO ESTADO OXIDATIVO-INFLAMATÓRIO IN VITRO DO CLORIDRATO DE ZIPRASIDONA

AUTOR: Thiago Duarte

ORIENTADOR: Prof^a. Dr^a. Ivana Beatrice Mânica da Cruz

Os antipsicóticos (APs) são usados para tratar a esquizofrenia e outros distúrbios psiquiátricos. A maioria destes medicamentos apresentam efeitos adversos causando obesidade e alterações metabólicas associadas ao estresse oxidativo e inflamação. Estudos relatam que a Ziprasidona (ZIP) diferentemente de outros APs, pode causar os mesmos efeitos de maneira atenuada, bem como respostas alérgicas. Atualmente, a causa dos efeitos desencadeados pela ZIP não está bem caracterizada e alguns pacientes não respondem satisfatoriamente ao tratamento talvez pela influência de polimorfismos genéticos. A ação do polimorfismo Val16AlaSOD2 causa um desbalanço superóxido-peróxido de hidrogênio (S-HP), o qual está envolvido com o metabolismo oxidativo-inflamatório. Moléculas bioativas presentes nos alimentos como xantinas e catequinas possuem efeito anti-inflamatório e antioxidante que podem influenciar na atenuação dos efeitos adversos desencadeados por este fármaco. Afim de compreender melhor estas informações, este estudo investigou o efeito *in vitro* da ZIP na resposta oxidativo-inflamatória de células imunes avaliando a potencial influência do polimorfismo Val16Ala-SOD2 e da matriz química do guaraná no mesmo na forma de três delineamentos experimentais conduzidos. No primeiro foi analisado o efeito *in vitro* da ZIP na resposta oxidativo-inflamatória de macrófagos RAW 264.7 expostos a diferentes concentrações de ZIP (18.5, 37.5, 75, 150, 300 µg/mL) utilizando-se a fitohemaglutinina (PHA) como controle positivo de inflamação e o lítio (Li) como controle negativo através de sua ação na taxa de proliferação celular, no ciclo celular, na modulação de marcadores oxidativos relacionados a resposta imune, na modulação dos níveis das citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatória e na modulação da expressão gênica destas citocinas via técnica qRT-PCR. O segundo protocolo *in vitro* foi conduzido utilizando células mononucleares de sangue periférico (CMSPs) obtidas de doadores saudáveis portadores de diferentes genótipos do polimorfismo Val16Ala-SOD2 expostas a ZIP em cultura celular de 72h. Posteriormente mensurou-se os marcadores anteriormente citados incluindo os níveis de marcadores lipoperoxidativos e de dano ao DNA. O terceiro protocolo avaliou o efeito da matriz química de xantina-catequina (XC-Mix) do pó de guaraná que apresenta moléculas bioativas na modulação da resposta oxidativo-inflamatória desencadeada pela ZIP em macrófagos RAW 264.7. O primeiro estudo mostrou que em macrófagos não ativados expostos à ZIP, houve indução de resposta inflamatória representada pelo espalhamento de macrófagos, aumento da proliferação celular, elevação dos níveis de moléculas oxidantes e das citocinas pró-inflamatórias e redução da citocina anti-inflamatória assim como regulação e expressão gênica de todas as citocinas. O segundo estudo demonstrou uma possível ação farmacogenômica do polimorfismo Val16Ala-SOD2 onde CMSPs ligadas ao genótipo AA expostas à ZIP apresentaram aumento dos níveis basais de H₂O₂ evidenciando um possível efeito genotóxico enquanto CMSPs ligadas ao genótipo VV apresentaram altos níveis de citocinas pró-inflamatórias. O terceiro protocolo evidenciou que a suplementação isolada e do XC-Mix promoveram efeito redutor na proliferação celular e diminuição dos níveis de marcadores inflamatórios, oxidativos e genotóxicos, contribuindo na modulação e no aumento dos níveis de citocina anti-inflamatória. O conjunto dos resultados descritos mostram apesar das limitações metodológicas, uma possível influência do polimorfismo em efeitos adversos desencadeados pela ZIP e que a matriz química do pó de guaraná pode garantir efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes. Os resultados tornam-se relevantes na clínica psiquiátrica abrindo a possibilidade da personalização da terapia antipsicótica assim como também estimula pesquisas para o desenvolvimento de métodos alternativos para o tratamento de distúrbios metabólicos associados.

Palavras Chaves: Esquizofrenia. Polimorfismo Val16Ala-SOD2. Ziprasidona. Inflamação. Estresse oxidativo. Guaraná.

ABSTRACT

INFLUENCE OF VAL16ALA-SOD2 GENETIC POLYMORPHISM AND THE GUARANÁ CHEMICAL MATRIX IN THE OXIDATIVE AND INFLAMMATORY STATE IN VITRO OF ZIPRASIDONE CHLORIDATE

AUTHOR: Thiago Duarte

ADVISOR: Prof^a. Dr^a. Ivana Beatrice Mânica da Cruz

Antipsychotics (APs) are used to treat schizophrenia and other psychiatric disorders. Most of these medications have adverse effects causing obesity and metabolic changes associated with oxidative stress and inflammation. Studies have reported that Ziprasidone (ZIP), unlike other APs, can cause the same effects in an attenuated manner, as well as allergic responses. Currently, the cause of the effects triggered by ZIP is not well characterized and some patients do not respond satisfactorily to the treatment, perhaps due to the influence of genetic polymorphisms. The action of the Val16AlaSOD2 polymorphism causes a superoxide-hydrogen peroxide (S-HP) imbalance, which is involved with oxidative-inflammatory metabolism. Bioactive molecules present in foods such as xanthines and catechins have an anti-inflammatory and antioxidant effect that may influence the attenuation of the adverse effects triggered by this drug. In order to better understand this information, this study investigated the in vitro effect of ZIP on the oxidative-inflammatory response of immune cells by evaluating the potential influence of the Val16Ala-SOD2 polymorphism and the guarana chemical matrix in the form of three experimental designs. In the first, we analyzed the in vitro effect of ZIP on the oxidative-inflammatory response of RAW 264.7 macrophages exposed to different ZIP concentrations (18.5, 37.5, 75, 150, 300 µg / mL) using phytohemagglutinin (PHA) as a positive control inflammation and lithium (Li) as a negative control through its action on the rate of cell proliferation, cell cycle, modulation of oxidative markers related to immune response, modulation of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines and modulation of the gene expression of these cytokines via the qRT-PCR technique. The second in vitro protocol was conducted using peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) obtained from healthy donors bearing different Val16Ala-SOD2 polymorphism genotypes exposed to ZIP in 72h cell culture. The previously mentioned markers were then measured, including levels of lipoperoxidative markers and DNA damage. The third protocol evaluated the effect of the xanthine-catechin (XC-Mix) chemical matrix of guarana powder that presents bioactive molecules in the modulation of the oxidative-inflammatory response triggered by ZIP on RAW 264.7 macrophages. The first study showed that in non-activated macrophages exposed to ZIP, there was induction of inflammatory response represented by macrophage spreading, increased cell proliferation, elevated levels of oxidant molecules and pro-inflammatory cytokines, and reduction of the anti-inflammatory cytokine as well as regulation and gene expression of all cytokines. The second study demonstrated a possible pharmacogenomic action of the Val16Ala-SOD2 polymorphism where CMSPs linked to the AA genotype exposed to the ZIP showed an increase of the basal levels of H₂O₂ evidencing a possible genotoxic effect while PBMCs linked to the VV genotype showed high levels of proinflammatory cytokines. The third protocol showed that XC-Mix supplementation promoted a reduction effect on cell proliferation and decreased levels of inflammatory, oxidative and genotoxic markers, contributing to the modulation and increase of anti-inflammatory cytokine levels. All of the described results show, despite the methodological limitations, a possible influence of the polymorphism on the adverse effects triggered by the ZIP and that the chemical matrix of guarana powder can guarantee anti-inflammatory and antioxidant effects. The results become relevant in the psychiatric clinic by opening the possibility of personalizing antipsychotic therapy as well as stimulating research for the development of alternative methods for the treatment of associated metabolic disorders.

Key words: Schizophrenia. polymorphism Val16Ala-SOD2. Ziprasidone. Inflammation. Oxidative stress. Guarana.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Apresentação

Figura 1 – Fluxograma do transtorno mental.....	17
Figura 2 – Sintomas positivos e negativos da esquizofrenia.....	25
Figura 3 – Hipótese neurobiológica dopaminérgica da esquizofrenia.....	29
Figura 4 – Síntese das hipóteses neurobiológicas da esquizofrenia.....	30
Figura 5 – Mecanismo de ação dos antipsicóticos de primeira geração.....	32
Figura 6 – Estrutura química da ziprasidona.....	37
Figura 7 – Esquema geral do protocolo experimental 1.....	59
Figura 8 – Esquema geral do protocolo experimental 2.....	62
Figura 9 – Esquema geral do protocolo experimental 3.....	64

Figuras do Artigo 1

Figura 1 – Ziprasidone (ZIP) effects on RAW 264.7 macrophage cells.....	78
Figura 2 – Ziprasidone (ZIP) effects on cell cycle RAW 264.7 macrophage cells.....	80
Figura 3 – Ziprasidone (ZIP) effects on oxidative markers of RAW 264.7 macrophage cells.....	81
Figura 4 – Ziprasidone (ZIP) effects on cytokines of RAW 264.7 macrophage cells.....	83

Figuras do Manuscrito

Figura 1 – Comparison of (A) nitric oxide (NO) levels and (B) cellular proliferation rate in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) carrying different Val16Ala-SOD2 SNP genotypes (AA, AV and VV) ziprasidone (ZIP) exposed in 72h cell cultures by two-way analysis of variance followed by Tukey post hoc test.....	100
Figura 2 – Comparison of different cytokines: (A) Interleukin 1 beta (IL-1 β);(B) IL-6; (C) tumor necrosis factor alpha (TNF α) and (D) IL-10 in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) carrying different Val16Ala-SOD2 SNP genotypes (AA, AV and VV) ziprasidone (ZIP) exposed in 72h cell cultures by two-way analysis of variance followed by Tukey post hoc test.....	101
Figura 3 – Comparison among different antioxidant enzymes and pro-oxidant markers in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) carrying different Val16Ala-SOD2 SNP genotypes (AA, AV and VV) ziprasidone (ZIP) exposed in 72h cell cultures by two-way analysis of variance followed by Tukey post hoc test.....	103

Figuras do Artigo 2

Figura 1 – Effect of different concentrations of Ziprasidone and/or caffeine, theobromine, catechin, Xanthine and Catechin mixture on macrophage proliferation in 72-hours cell cultures.....	126
---	-----

Figura 2 – Macrophage activation and proliferation. A- RAW 264.7 monocyte inactivated cells (×40), scale bar=20 μm; B macrophage activation observed by change of cell morphological patterns (arrow) (×40). C- Cell proliferation analised by MTT test after 72 hours of the cell culture. D- Nitric Oxid levels determined by a modified Griess method quantifying nitrite/nitrate concentrations, after 72 hours of the cell culture.....	128
Figura 3 – Comparison of changes in the levels of oxidative markers. 8-OHdG =DNA oxidation, LPX= Lipoperoxidation, Pcarb= Carbonylation of proteins in macrophages treated with Ziprasidone (ZIP) isolated and Zip + xanthine–catechin (XC) mixture, incubated for 72 hours.....	129
Figura 4 – Effect of Ziprasidone and Xanthine-Catechin mixture cytokines proteic levels and gene expression.....	131

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Síntese das principais teorias da esquizofrenia.....	26
Tabela 2 – Principais efeitos adversos da ziprasidona.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

8-oxodGuo	8-Oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina
5-HT	Serotonina
5-HT2	Receptores da Serotonina
AAr	Ácido araquidônico
AA	Genótipo alanina-alanina
AA-CMSPs	Células mononucleares do sangue periférico ligadas ao genótipo AA
ANOVA	Análise de variância de uma via
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AP	Antipsicóticos
APGs	Antipsicóticos de primeira geração
ASGs	Antipsicóticos de segunda geração
ATCC	<i>The American Type Culture Collection</i>
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
CAF	Cafeína
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CAT	Catalase
CAQ	Catequina
CEAF	Componente Especializado da Assistência Farmacêutica
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
ChAT	Colina acetiltransferase
CMSP	Células mononucleares do sangue periférico
CRP	Proteína c reativa
Cu ⁺²	Íon cobre
D2	Receptores dopamínicos
DA	Dopamina
DAMPs	Padrões moleculares associados ao dano
DCFH-DA	Diclorofluoresceína
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DSM-V	Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais V
DT	Discinesia Tardia
EPA	Ácido eicosapentanóico
EGCG	Galato de epigalocatequina
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
Fe ⁺²	Íon ferro
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GB	Glóbulos brancos
GCT	Alanina
GTT	Valina
GLU	Glutamato
GSH	Glutathione
GSH-Px	Glutathione peroxidase
GSK-3	Glicogênio sintase quinase 3
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HbA1c	Hemoglobina glicada
HDL	Lipoproteínas de alta densidade

HPA	Eixo adrenocortical
IFN γ	Interferon gama
IL-10	Interleucina 10
IL-1ra	Receptor antagonista de Interleucina 1
IL-1 / IL-1 β	Interleucina 1 / Interleucina 1 β
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade
Li	Lítio
LPS	Lipopolissacarídeo
LSD	Dietilamida do ácido lisérgico
MMP-9	Metaloproteinases da matriz 9
MAMPs	Molécula associada à infecção microbiana (<i>Microbe-Associated Molecular Patterns</i>)
MDA	Malondialdeído
MTS	Mitochondrial Target Sequence (sequência mitocondrial alvo)
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NBT	Reagente nitro blue tetrazolium
NF- $\kappa\beta$	Fator nuclear kappa β
NLR	Relação neutrófilos-linfócitos
NMDA	N-metil-D-aspartato
ON	Oxido Nítrico
ONS1	Oxido Nítrico Sintase 1
$^1\text{O}_2$	Oxigênio singlete
$\text{O}_2\cdot^-$	Radical superóxido
$\text{OH}\cdot$	Radical hidroxila
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONOO \cdot	Peroxinitrito
OxDNA	DNA oxidado
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PHA	Fitohemaglutinina
PENT	Pentoxifilina
PI	Iodeto de Propídeo
PLR	Relação plaquetas-linfócitos
PUFAs	Ácidos graxos poliinsaturados de membrana facilmente oxidáveis
Receptores D	Receptores dopaminérgicos
SBF	Soro bovino fetal
SCZ	Esquizofrenia
SEP	Sintomas extra-piramidais
S-HP	Desbalanço ou desequilíbrio superóxido-peróxido de hidrogênio
SM	Síndrome metabólica
SNC	Sistema nervoso central
SOD	Enzima superóxido dismutase
SOD1	Superóxido dismutase dependente de zinco
SOD2	Superóxido dismutase dependente de manganês
SUS	Sistema Único de Saúde
TBARS	Ácido tiobarbitúrico
TD	Discinesia tardia
TEB	Transtornos do espectro bipolar
TEO	Teobromina

TNF α	Fator de necrose tumoral alfa
Val16Ala-SOD2	Polimorfismo valina16alanina da SOD2
VV	Genótipo valina-valina
VV-CMSPs	Células mononucleares do sangue periférico ligadas ao genótipo VV
XC-Mix	Mistura / Mix xantina-catequina ou matriz química do pó de guaraná
ZIP	Ziprasidona

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 TRANSTORNOS MENTAIS	17
1.2 PSICOSES	18
1.3 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E FISIOPATOLÓGICOS DA SCZ	21
1.3.1 Epidemiologia da SCZ	21
1.3.2 Sub-tipos diagnósticos da SCZ	22
1.3.3 Fases, sinais e sintomas da SCZ	23
1.3.4 Etiologia da SCZ: principais teorias	26
1.4 TERAPEUTICA NA SCZ	30
1.4.1 Antipsicóticos (AP)	31
1.4.2 Efeitos adversos de AP	33
1.4.3 Cloridrato de ziprasidona	36
1.5 O METABOLISMO OXIDATIVO ASSOCIADO À SCZ	41
1.5.1 O papel do polimorfismo Val16Ala-SOD2 na SCZ	44
1.6 O METABOLISMO INFLAMATÓRIO NA SCZ	47
1.6.1 O polimorfismo Val16Ala-SOD2 na modulação inflamatória	51
1.7 ZIPRASIDONA E O METABOLISMO OXIDATIVO-INFLAMATÓRIO	52
1.8 EFEITO DE SUPLEMENTOS ALIMENTARES NA ATENUAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA DE FÁRMACOS ANTIPSICÓTICOS	53
1.8.1 A matriz química do guaraná como potencial agente farmacológico na modulação de efeitos colaterais de antipsicóticos atípicos	54
2 OBJETIVOS	58
2.1 OBJETIVO GERAL	58
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	58
3 MATERIAIS E MÉTODOS	58
3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E CONDIÇÕES DE CULTIVO CELULAR	58
3.1.1 Protocolo <i>in vitro</i> 1	59
3.1.2 Protocolo <i>in vitro</i> 2	61
3.1.3 Protocolo <i>in vitro</i> 3	63
3.2 ENSAIOS EXPERIMENTAIS	65
3.2.1 Ensaio MTT	65
3.2.2 Quantificação de marcadores do metabolismo oxidativo	65
3.2.3 Marcadores de dano oxidativo	66

3.2.4	Análise do ciclo celular via citometria de fluxo.....	67
3.2.5	Análise dos níveis de citocinas por imunoensaio ELISA.....	67
3.2.6	Análise dos níveis dano de dna por imunoensaio ELISA.....	68
3.2.7	Análise da expressão gênica via qRT-PCR.....	68
3.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	69
4	RESULTADOS.....	70
4.1	ARTIGO 1	71
4.2	MANUSCRITO.....	90
4.3	ARTIGO 2	116
5	DISCUSSÃO.....	144
6	CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	156
7	REFERÊNCIAS.....	157
	ANEXO A – COMPROVANTE DE PUBLICAÇÃO DO ARTIGO 1	179
	ANEXO B – COMPROVANTE DE PUBLICAÇÃO DO ARTIGO 2.....	180
	ANEXO C – ERRATA DE PUBLICAÇÃO DO ARTIGO 2.....	181
	ANEXO D – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA (CONEP).....	182

1 INTRODUÇÃO

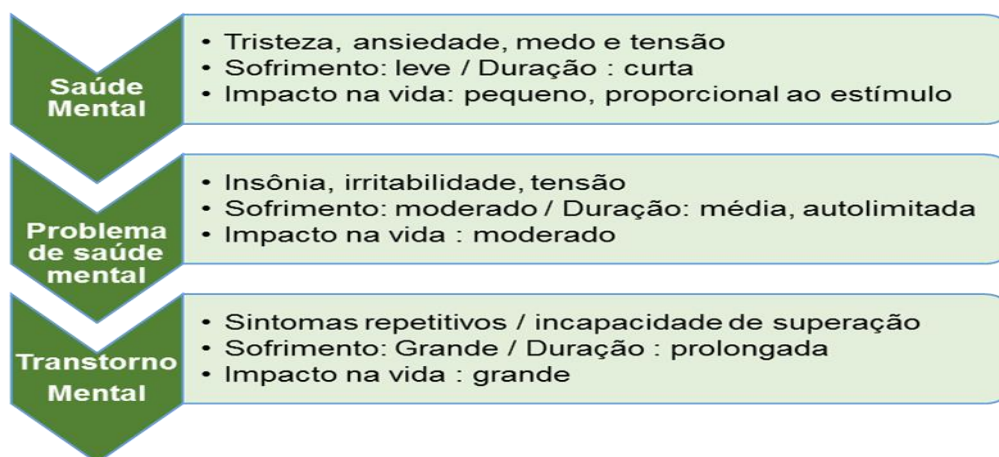
1.1 TRANSTORNOS MENTAIS

Mundialmente os transtornos mentais representam um sério problema de saúde pública nas sociedades contemporâneas. Das dez principais causas de incapacidade humana para o trabalho e convívio social, cinco são transtornos psiquiátricos. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) os transtornos mentais afetam mais de 450 milhões de pessoas em todo o mundo e entre 75% e 85% das pessoas que sofrem desses males não têm acesso a tratamento adequado (WHO, 2017).

No Brasil, a estimativa é de que 25 milhões de pessoas passem por tais problemas, sendo ao menos 5 milhões em níveis de moderado a grave (GONCALVES et al., 2014). Dentre os transtornos mais frequentes, estão os transtornos depressivos, transtornos do espectro bipolar (TEBs) e esquizofrenia (SCZ). Adicionalmente, também fazem parte destes distúrbios a doença de Alzheimer, demências, retardo mental, e transtornos mentais da infância e adolescência (WHO, 2017).

O transtorno mental surge quando a saúde mental é afetada, ocorrendo um funcionamento inadequado e insatisfatório da mente, emoções e pensamentos (HIGGINS & GEORGE, 2010; GABBARD, 2016), conforme figura 1.

Figura1: Fluxograma do Transtorno Mental



Fonte: Adaptado de Higgins & George (2010)

Os transtornos mentais, também são chamados de doenças mentais, caracterizadas por alterações do funcionamento da mente que prejudicam o desempenho da pessoa na vida familiar, social e profissional, na compreensão de si mesmo e dos outros, na possibilidade de autocrítica, na tolerância aos problemas e na possibilidade de ter prazer na vida em geral (POTUZAK et al., 2012). Estes transtornos afetam aspectos biológicos, psicológicos e sociais do indivíduo e se caracterizam por alterações do pensamento, do humor e do comportamento (ou uma combinação de fatores), associadas à angústia e prejuízo no funcionamento global (SADOCK; SADOCK & RUIZ, 2017).

Alguns transtornos mentais apresentam na sua sintomatologia a ocorrência de psicoses, especialmente na SCZ e também em estágios avançados do transtorno bipolar. As psicoses são caracterizadas pela distorção do senso de realidade, uma inadequação e falta de harmonia entre o pensamento e a afetividade, que pode afetar todas as faixas etárias (FUENTES et al., 2013).

1.2 PSICOSES

De acordo com o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais V (DSM-V), do inglês, *Diagnostic and Statistical Manual fifth-edition* a psicose é um sintoma da perturbação mental caracterizado pela presença de uma ou mais das seguintes manifestações: perda de encadeamento lógico do pensamento, incapacidade de julgamento, percepção incorreta da realidade, alucinações (DSM-V, 2014).

A ocorrência de surtos psicóticos está também associada aos fatores genéticos, sociais, como a vida agitada nas grandes cidades, a violência (física, sexual e psicológica) (BRASIL, 2013), a insônia por longos período de tempo, estresse psicológico severo (DSM, 2014), doenças infecciosas (HIV, sífilis), doenças vasculares (acidente vascular cerebral, trombozes, infarto agudo do miocárdio) doenças crônicas (Alzheimer, autoimunidade, epilepsia, neoplasias, insuficiência hepática e renal) e ao isolamento social os quais podem estar direta ou indiretamente associados (HIGGINS & GEORGE, 2010).

O abuso ou abstinência de substâncias como o álcool e alguns tipos de drogas (cocaína, anfetamina, dietilamida do ácido lisérgico), principalmente as do tipo estimulantes, é o principal fator de risco para o surgimento de uma psicose (DALGALARRONDO, 2008; HIGGINS & GEORGE, 2010).

O desenvolvimento fora dos padrões da normalidade na infância, como atraso escolar, dificuldade de socialização e de comunicação, também podem indicar predisposição a algum transtorno mental (SADOCK; SADOCK & RUIZ, 2017). Uma provável interação entre esses fatores sociais com fatores biológicos e psicológicos produziria uma reação em cascata, resultando, assim, no desenvolvimento do quadro psicótico (FUENTES et al., 2013).

Notadamente os delírios psicóticos podem ser descritos como falsas crenças fixas a respeito da realidade, alterações do pensamento que colocam o indivíduo frente a uma percepção falsa ou sem sentido dos acontecimentos à sua volta, tais como: delírios de paranoia: por exemplo a pessoa pensa que tem alguém a seguindo ou que está recebendo mensagens secretas pelos meios de comunicação; delírios de grandeza: por exemplo a pessoa pensa ser alguém de muita importância, como algum talento grandioso ou ser um mensageiro divino; delírios somáticos: por exemplo a pessoa acredita que tem uma doença terminal ou alguma doença física, quando, na verdade, está saudável (DALGALARRONDO, 2008; GABBARD, 2016).

Os delírios inicialmente aparecem como impressões distorcidas a respeito de sinais que a pessoa percebe como enviados para si ou dificuldade de distinguir seus pensamentos como realidade ou imaginação. Com o tempo essas impressões vão se solidificando e constituindo certezas, guiando as ações da pessoa afetada pela psicose. Como são percepções fixas, se torna difícil convencer a pessoa a perceber a natureza de seus pensamentos (HIGGINS & GEORGE, 2010).

As alucinações são alterações dos sentidos (também chamadas alterações da sensopercepção). O indivíduo vê, sente, ouve ou sente cheiro de algo que não existe. O tipo de alucinação mais comum é a auditiva seguida da alucinação visual. Na alucinação auditiva, a pessoa em crise psicótica escuta uma ou mais pessoas falando, com vozes imperativas, dando ordens, que podem ser interpretadas como provenientes do sobrenatural, de Deus. Na alucinação visual, a pessoa vê coisas, animais ou pessoas que não existem. Também ocorrem alucinações olfativas (tais como sentir cheiros inexistentes) (BRASIL, 2013)

A desorganização do pensamento e da comunicação se manifesta pela incapacidade de formular frases com sentido real, não conseguindo manter a concentração em uma conversa e interrompendo frases sem completá-las, fazendo uso de palavras sem conexão (GABBARD, 2016).

O isolamento social ocorre em função da mudança no comportamento e nos sentimentos, pois o indivíduo com psicose pode se tornar ativo ou letárgico, apresentar crises de riso de forma inadequada, ficar chateado ou com raiva sem motivo aparente e apresentar declínio no rendimento escolar ou laboral. Também poderá apresentar mudanças nos sentimentos sem motivo aparente (SADOCK; SADOCK & RUIZ, 2017).

O transtorno psicótico pode se apresentar de diferentes maneiras e períodos, recebendo denominações específicas como segue: o transtorno delirante caracteriza-se por pelo menos um mês de delírios, ainda que nenhum outro sintoma psicótico esteja presente; o transtorno psicótico breve dura mais de um dia e regride em um mês; o transtorno esquizofreniforme caracteriza-se por uma apresentação sintomática equivalente à da SCZ, exceto pela duração (menos de seis meses) e pela ausência de exigência de declínio funcional (DSM, 2014; HIGGINS & GEORGE, 2010); a SCZ dura pelo menos seis meses, incluindo ao menos um mês de sintomas da fase ativa; no transtorno esquizoafetivo, um episódio de humor e sintomas da fase ativa da SCZ ocorrem concomitantemente, tendo sido antecedidos ou seguidos de pelo menos duas semanas de delírios ou alucinações sem sintomas proeminentes de humor (DSM, 2014; GABBARD, 2016).

No transtorno psicótico induzido por substância ou medicamento, os sintomas psicóticos são entendidos como consequência fisiológica de uma droga de abuso, um medicamento ou exposição a uma toxina, cessando após a remoção do agente (CORDIOLI; GALLOIS & ISOLAN, 2015). No transtorno psicótico devido a uma patologia, acredita-se que os sintomas psicóticos sejam uma consequência fisiológica direta da patologia ou de outra condição clínica (POTUZAK et al., 2016).

Os mais importantes tipos de psicose são: a SCZ; os distúrbios afetivos como depressão e mania e as psicoses orgânicas causadas por traumatismo, álcool, drogas ou outras doenças orgânicas (FUENTES et al., 2013).

A SCZ é considerada o tipo de psicose mais grave porque seus sintomas são mais intensos e persistentes, podendo levar à deterioração de funções cognitivas e

sociais, e acarretar maior prejuízo na vida pessoal e familiar (HIGGINS & GEORGE, 2010; NARDI; QUEVEDO & SILVA, 2015; SADOCK; SADOCK & RUIZ, 2017).

1.3 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E FISIOPATOLÓGICOS DA SCZ

O termo SCZ significa "cisão das funções mentais", do grego *schizo* = divisão, cisão; *phrenos* = mente. Este termo foi utilizado em 1911 pelo psiquiatra suíço Eugen Bleuler, para pacientes que apresentavam desconexão entre os processos de pensamentos e as respostas emotivas (VALLS, 2010).

1.3.1 Epidemiologia da SCZ

A SCZ não é caracterizada como uma doença única, mas como um grupo de síndrome, atingindo todas as classes sociais e grupos humanos. Afeta tanto homens quanto mulheres, sendo que os primeiros sintomas ocorrem entre os 15 e 20 anos em homens, e em mulheres entre os 20 e 30 anos sendo mais prevalente no sexo masculino (OWEN et al., 2016; WHO, 2017). Nas mulheres, a SCZ tende a começar mais tarde e ser mais branda. Quando tem início na infância aparece depois dos cinco anos. A SCZ infantil é rara e pode ser difícil diferenciá-la de outros transtornos de desenvolvimento da infância, como o autismo (VASKINN et al., 2015; VASKINN et al., 2016).

A SCZ afeta 23 milhões de pessoas em todo o mundo o que corresponde 1% da população mundial (WHO, 2017), chegando a 2,3% quando associada a outros transtornos psicóticos (UGUZ et al., 2015). Considerando a média de 1% sob a população brasileira, estima-se que cerca de 1,6 milhões de pessoas no Brasil sejam esquizofrênicas, número elevado que exige investimentos dos órgãos públicos e recursos adequados para o tratamento (BRASIL, 2011).

A incidência é de um a sete casos novos por ano a cada 10.000 habitantes, dependendo do critério diagnóstico adotado (WHO, 2017). É uma patologia de difícil regressão, onde em torno de 95% dos pacientes manifesta-se na forma crônica e aproximadamente 15% destes indivíduos tornam-se capazes de manter uma rotina próxima da normalidade (MCGRATH et al., 2008; POPOVIC et al., 2014).

Em torno de 10% dos pacientes esquizofrênicos apresentam morte precoce induzida pelo suicídio, sendo assim a SCZ carrega co-morbidade médica e conseqüentemente um risco entre duas a três vezes maior de mortalidade, face à população em geral, o que se traduz numa redução entre 10 a 25 anos na esperança média de vida (WOLFERSDORF et al., 2016).

1.3.2 Sub-tipos diagnósticos da SCZ

A SCZ é um transtorno crônico e debilitante caracterizado por sintomas positivos (alucinações, delírios, agitação motora involuntária) e negativos (avolição, anedonia, alogia), trazendo prejuízos sociais, cognitivos e funcionais. É caracterizada pela presença de um comportamento psicótico, de pensamento irrealista e desorganizado, além de uma marcada disfunção social. Os relacionamentos interpessoais estão comprometidos e alterados e a autoestima diminuída e uma grande percentagem mantém contatos sociais limitados (SADOCK; SADOCK & RUIZ, 2017).

É uma doença multifatorial e multi-sintomática, cujas alterações cerebrais são tanto de ordem química como estrutural. Especula-se que em alguns casos, as alterações são induzidas por vírus e traumas encefálicos durante o período gestacional ou nos primeiros meses de vida (HIGGINS & GEORGE, 2010).

Segundo o DSM V existem 6 tipos diferentes de SCZ: simples, indiferenciada, paranóide, desorganizada, catatônica e residual. A SCZ simples é a menos frequente, iniciada na adolescência com emoções irregulares ou pouco apropriadas, podendo ser seguida de um longo isolamento social, perda de amigos, poucas relações reais com a família e mudanças de personalidade, passando de sociável ao isolamento social e terminando em depressão; a SCZ indiferenciada é assim classificada pois os doentes esquizofrênicos nem sempre apresentam os sintomas clássicos; na SCZ paranóide predominam sintomas positivos como alucinações e enganos, com uma relativa preservação do funcionamento cognitivo e afetivo e seu início tende a ser mais tardio que o dos outros tipos; a SCZ hebefrênica caracteriza-se por um discurso desorganizado e sintomas negativos como o embotamento emocional e trejeitos faciais; na SCZ catatônica os sintomas motores são proeminentes, como atividade motora excessiva, extremo negativismo (manutenção de uma postura rígida contra

tentativas de mobilização, ou resistência a toda e qualquer instrução), mutismo, cataplexia (paralisia corporal momentânea), ecolalia (repetição patológica aparentemente sem sentido de uma palavra ou frase que outra pessoa acabou de falar) e ecopraxia (imitação repetitiva dos movimentos de outra pessoa); A SCZ residual é assim denominada para indivíduos que já possuem por muitos anos e com muitas consequências, onde podem predominar sintomas como o isolamento social, o comportamento excêntrico, emoções pouco apropriadas e pensamentos ilógicos (LIEBERMAN; STROUP & PERKINS, 2012; DSM, 2014; SADOCK; SADOCK & RUIZ, 2017).

1.3.3 Fases, sinais e sintomas da SCZ

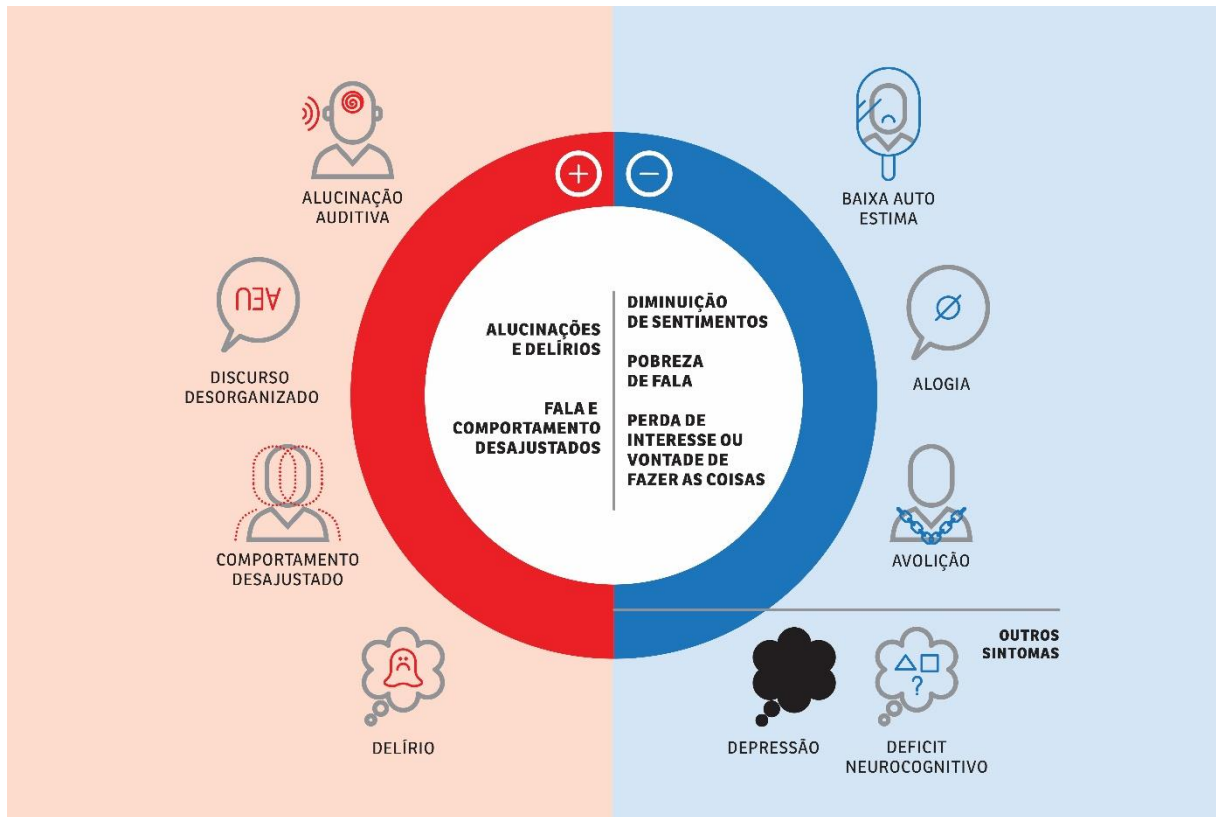
O diagnóstico baseia-se principalmente na história do paciente e no exame do estado mental, visto não existir exames laboratoriais para esta condição. O quadro clínico é dividido em vários subtipos: paranóide, desorganizado, catatônico, indiferenciado e residual, de acordo com a prevalência de determinados sintomas, não existindo um sinal ou sintoma clínico patognomônico desta patologia, pois todos os sinais ou sintomas psiquiátricos são também observados em outros transtornos psiquiátricos e neurológicos (FUENTES et al., 2013; SADOCK; SADOCK & RUIZ, 2017).

A manifestação da SCZ pode ser dividida em quatro fases: pré-mórbida, prodrômica, progressão e estabilização. Na fase pré-mórbida o paciente apresenta ansiedade social, deficits de memória verbal, atenção e funções executivas (NARDI; QUEVEDO & SILVA, 2015); a fase prodrômica corresponde um período de tempo variável, geralmente de meses, que antecede a psicose, onde o indivíduo pode apresentar um estado de apreensão e perplexidade e sem um foco aparente aumentando o seu isolamento e o aparecimento de atitudes excêntricas, podendo ocorrer sintomas psicóticos breves e transitórios (SADOCK; SADOCK & RUIZ, 2017). A etapa de progressão ocorre após o primeiro episódio de psicose onde se inicia a deterioração do estado de saúde do indivíduo. A SCZ evolui para fase de estabilização do estado de saúde do indivíduo, embora possa ocorrer recaídas. Os sintomas negativos muitas vezes são detectáveis desde o princípio, ao passo que os sinais positivos ocorrem durante o período de exacerbação (POTUZAK et al., 2012).

Os sintomas positivos estão relacionados a situações que começam a acontecer , ou seja, um acréscimo ou distorção das funções normais, tais como: alucinações (percepção irreais que podem ocorrer em qualquer modalidade sensorial como auditivas, visuais, olfativas, gustativas e táteis; perturbações do pensamento como incoerência, desagregação e falta de lógica; comportamento desorganizado, bizarro ou inadequado; agitação psicomotora; negligência dos cuidados pessoais e delírios onde ocorre a interpretação errônea da realidade dos mais variados temas como persecutórios, referenciais, somáticos, religiosos ou grandiosos. O delírio referente a perseguição é o mais frequente, onde o indivíduo acredita que certos gestos, comentários, figuras ou outros fatores e estruturas ambientais são direcionados contra ele (HIGGINS & GEORGE, 2010; SADOCK; SADOCK & RUIZ, 2017).

Os sintomas negativos ocorrem na fase inicial da doença e podem coexistir com os sintomas positivos e tipicamente persistem após tratamento e tendem a ser mais comuns em pacientes mais velhos do que nos mais jovens. Estes sintomas estão relacionados as situações que param de acontecer, onde ocorre limitações da intensidade e amplitude como da afetividade, ocorrendo o embotamento afetivo; da fluência e produtividade do pensamento, pobreza da fala e de conteúdo (alogia); incapacidade de iniciar e persistir em atividades dirigidas aos objetivos (avolição); ausência de sentimento de prazer em fazer algo (anedonia); isolacionismo; e prejuízo atencional (KAPLAN & SADOCK, 2008; GABARDO, 2016; SADOCK; SADOCK & RUIZ, 2017) conforme mostrado na figura 2.

Figura 2: Sintomas positivos e negativos da SCZ



Fonte: O autor

Além dos sintomas clássicos da SCZ, existem os sintomas cognitivos relacionados ao processamento de informações, pois a cognição está relacionada com a forma como o cérebro trabalha na aprendizagem, classificação e uso de informações. O indivíduo com SCZ tem dificuldades com sua memória de trabalho, não sendo capaz de manter o controle de diferentes tipos de fatos, ao mesmo tempo, como anotar um número de telefone e seguir instruções (GABBARD, 2016).

Os sintomas do paciente ocorrem de maneira peculiar e podem variar com o passar do tempo, como alucinações intermitentes, capacidade laborativa e interação social, alterações do humor, que podem ir e vir durante o curso da doença. Para diagnosticar a doença, é necessário a presença de pelo menos dois sintomas psicóticos, durante no mínimo um mês em um período de pelo menos seis meses (DSM, 2014; FUENTES et al., 2013; SADOCK; SADOCK & RUIZ, 2017).

1.3.4 Etiologia da SCZ: principais teorias

As causas da SCZ são ainda desconhecidas, contudo, sabemos que é uma patologia complexa e multifatorial, embora haja consenso em atribuir a desorganização da personalidade, à interação de variáveis culturais, psicológicas e biológicas, entre as quais destacam-se as de natureza genética.

Várias são as teorias que tentam explicar a etiologia da SCZ, como a teoria genética, neurobiológica, neurodesenvolvimental e estrutural. A Tabela 1 apresenta uma síntese das principais teorias baseada em informações apresentadas no DSM-V.

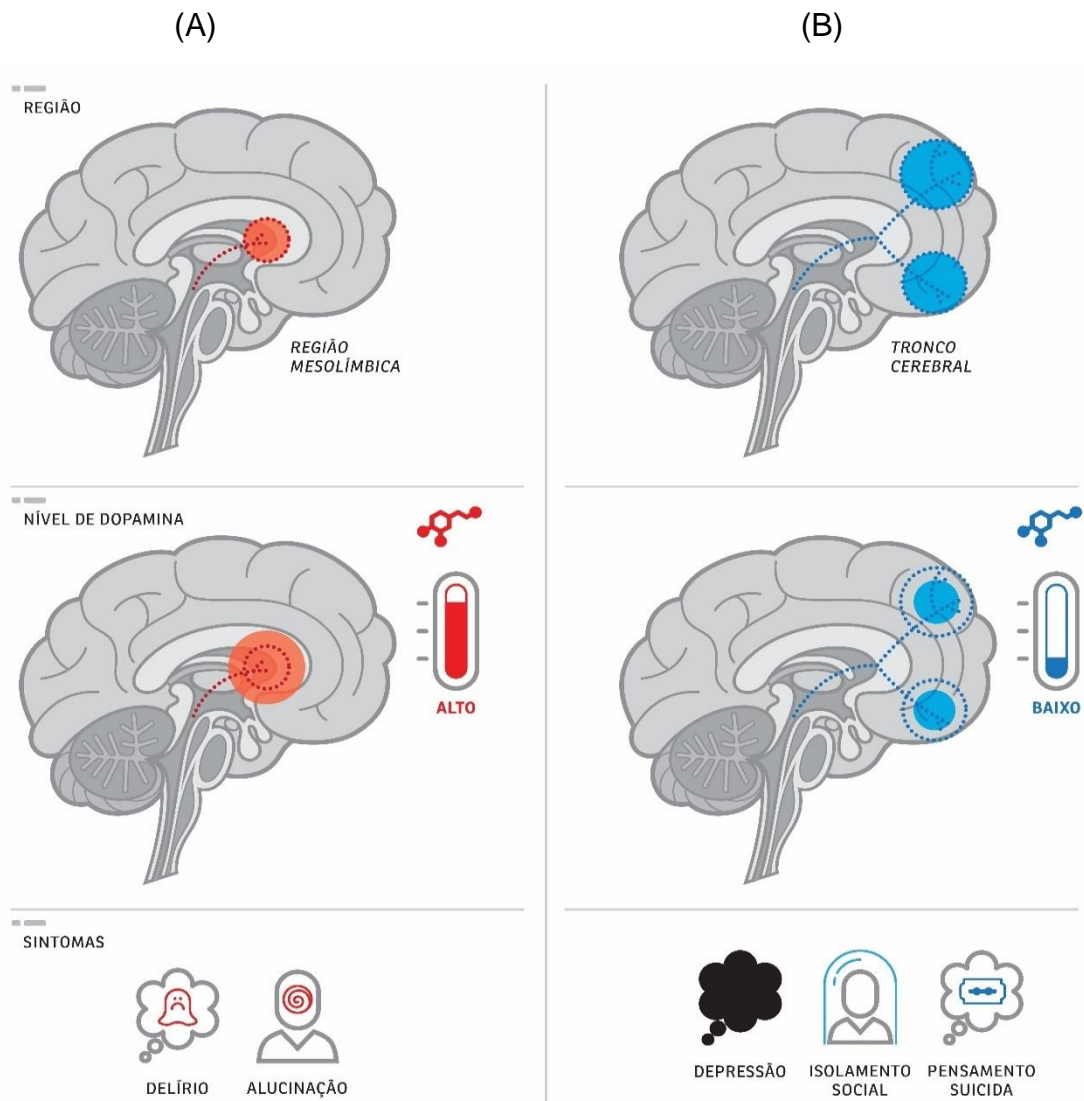
Tabela 1: Síntese das principais teorias da esquizofrênia, SCZ

Teoria Genética	
<p>A contribuição relativa de fatores genéticos envolvidos na SCZ foi estimada em até 80% a partir de estudos em gêmeos dizigóticos e monozigóticos. O modo de herança é complexo, não-mendeliano e, na maioria dos casos, envolve a ação combinada de um grande número de genes (GIEGLING, et al., 2017). Assim, a SCZ é considerada uma doença poligênica complexa, onde mais de 3.000 genes candidatos já foram relatados, a maioria dos quais sendo mencionados apenas uma vez. Genes localizados em vários cromossomos têm sido implicados com a gênese da patologia: 1, 6, 8, 13, 15 e 22. Os genes de susceptibilidade para a SCZ são, muito provavelmente, os situados no cromossoma 6p22.1, (YOON et al., 2016). Os alelos de risco identificados até agora também têm sido associados a outros transtornos mentais, incluindo o transtorno bipolar, depressão e transtorno do espectro autista (DSM, 2014). Indivíduos que possuem parentes em primeiro grau com SCZ possuem um risco aumentado em desenvolver a doença. Esta teoria não descarta a relevância dos aspectos ambientais que modulam o risco da SCZ (SARIASLAN; LARSSON & FAZEL, 2016). Evidências sugerem que a expressão gênica no córtex pré-frontal apresenta diferenças entre indivíduos saudáveis e SCZ (MLADINOV et al., 2016).</p>	
Teoria Neurobiológica	
<p>Considera que a SCZ é causada principalmente por alterações bioquímicas e estruturais do cérebro, devido às disfunções nos sistemas glutamatérgico, dopaminérgico e serotoninérgico (GABBARD, 2016).</p>	
Neurobiológica Dopaminérgica	<p>Os corpos dos neurônios que sintetizam dopamina estão localizados, especialmente no núcleo do estriado ventral; no lobo pré-frontal do córtex cerebral e no estriado dorsal, os quais fazem parte do sistema extrapiramidal, sendo assim, a teoria da dopamina considera que as vias dopaminérgicas cortical, mesolímbica, mesocortical, nigroestriatal e tuberoinfundibular estão implicadas na mediação dos sintomas positivos e negativos da SCZ (figura 3). A via dopaminérgica nigroestriatal também está comprometida na SCZ, sendo responsável por transtornos de movimento hiperkinéticos, como coreia, discinesias e tiques. Além disso, ocorre comprometimento também da via mesocortical, a qual está relacionada aos sintomas negativos e cognitivos, em consequência do déficit de dopamina no córtex pré-frontal dorsolateral (HILAL-DANDAN & BRUNTON, 2016). O desequilíbrio da interação da dopamina com seus</p>

	<p>receptores afeta outros sistemas de neurotransmissores que interagem com o ácido gama-aminobutírico (GABA), serotonina, glutamato, acetilcolina/receptor nicotínico, neuropeptídios como a substância P e neurotensina e o sistema canabinoide (CORDIOLI; GALLOIS & ISOLAN, 2015).</p> <p>Assim, esta teoria tenta explicar a neurogenese da SCZ, através da ação de fármacos antipsicóticos relacionados à sua afinidade com os receptores dopaminérgicos (receptores D). Quanto maior a afinidade do fármaco com receptores D, maior sua eficácia na redução dos sintomas da SCZ (ZHUO et al., 2017). Os neurônios do córtex cerebral e hipocampo, expressam principalmente os receptores D1 e D5 os quais possuem baixa afinidade com a maioria dos antipsicóticos. Muitas drogas de abuso elevam os níveis de dopamina ampliando ou produzindo sintomas psicóticos positivos. A anfetamina, a dietilamida do ácido lisérgico (LSD) e o crack aumentam a síntese de dopamina ou impedem a sua receptação podendo desencadear manifestações paranoides, indistinguíveis de SCZ em pessoas saudáveis (CORDIOLI; GALLOIS & ISOLAN, 2015). A hipótese dopaminérgica mesolímbica explica a semelhança entre os sintomas da SCZ e os efeitos de psicoestimulantes, sugerindo que outros transtornos mentais ou drogas psicoativas (incluindo alguns fármacos) estejam relacionados com a doença (LÜLLMANN; MOHR & HEIN, 2017).</p>
<p>Neurobiológica glutamatérgica</p>	<p>O glutamato é o neurotransmissor mais abundante no cérebro de mamíferos cuja função principal é mediar a transmissão sináptica excitatória por todo o cérebro e na medula espinal. Está relacionado com funções cognitivas e em especial na aprendizagem e memória (HARDINGHAM & DO, 2016; GUYTON & HALL, 2017). Distúrbios no sistema glutamatérgico estão envolvidos na fisiopatologia da SCZ e de outras doenças como: epilepsia, isquemias, doença de Alzheimer e doença de Huntington, dependência química, transtorno obsessivo compulsivo e transtorno afetivo bipolar (STAAL et al., 2000). Existem duas categorias de receptores glutamatérgicos: NMDA (N-metil-D-aspartato), que são ionotrópicos e os não-NMDA, que são metabotrópicos. Os do tipo NMDA são extremamente importantes para a plasticidade neuronal, e responsáveis pelo potencial de ação de longo prazo e excitotoxicidade (GUYTON & HALL, 2017), tendo sido associados a fisiopatologia da SCZ (GOLUBEVA et al. 2016). A teoria da hipofunção dos receptores NMDA é fundamentada pela evidência de que antagonistas dos receptores NMDA, como a fenilciclidina (PCP) que promovem o bloqueio deste receptor e a cetamina, dentre outros, induzem mudanças comportamentais, como disfunção cognitiva e psicose que se assemelham a SCZ (ARRUDA et al., 2008; OHNUMA; ARAI, 2011; LIN; LANE; TSAI, 2011; GOLUBEVA et al. 2016) (figura 4).</p>
<p>Neurobiológica serotoninérgica</p>	<p>A teoria serotoninérgica na SCZ surgiu ao se verificar que certas drogas alucinógenas, com semelhança estrutural à serotonina (5-HT) geravam uma psicose semelhante à SCZ. Estudos realizados por Perkovic e colaboradores (2016) verificaram níveis elevados de 5-HT nas plaquetas e no sangue dos pacientes esquizofrênicos, junto com uma redução da atividade da enzima MAO (Monoamino Oxidase), responsável pela catálise da 5-HT (PERKOVIC et al., 2016). A serotonina induz efeito modulador inibitório nos neurônios dopaminérgicos de tipo D2 do estriado e da substância negra, sendo assim, as alterações dos mecanismos serotoninérgicos no córtex pré-frontal dos esquizofrênicos</p>

	podem resultar em uma hiperfunção dopaminérgica (ŠVOB; PIVAC & MÜCK-ŠELER, 2016) (figura 4).
Teoria neurodesenvolvimental e estrutural	
<p>Considera que a SCZ é fruto da interação entre fatores genéticos e ambientais ao longo do desenvolvimento do sistema nervoso, a qual pode aumentar a suscetibilidade para o aparecimento da doença (ANSEN-WILSON & LIPINSKI, 2016). Esta hipótese baseia-se no fato de que o cérebro de indivíduos esquizofrênicos apresenta redução de volume, peso e das áreas frontais e temporais, diminuição no número e tamanho dos neurônios, além disso é eletricamente diferente, apresentando potenciais elétricos maiores em repouso que o cérebro padrão, que seria de 20 microvolts. Este estudo apoia a ideia de hipofunção do córtex frontal (GABBARD, 2016).</p>	
Alterações associadas ao período embrionário e primeira infância	<p>O desenvolvimento neuronal ocorre em várias fases, como a proliferação celular dos neurônios, células da glia, a migração celular, a diferenciação morfológica e bioquímica e a formação de sinapses e depende da carga genética individual, mas podem ser moduladas por fatores ambientais. O ambiente aumenta o fator de risco de SCZ principalmente durante o período pré-natal ou perinatal de vida sugerindo que esta patologia pode ser um transtorno do desenvolvimento neural, uma vez que os sintomas ocorrem mais tarde (GABBARD, 2016). Assim, doenças crônicas presentes na mãe, como é o caso de gestantes diabéticas ou com hiperinsulinemia que leva ao aumento dos níveis plasmáticos de cortisol (KONTOANGELOS et al., 2015), desnutrição (macro e micronutrientes, em especial zinco, cobre, magnésio, potássio e vitaminas B3, B6, B12 e C) (LIM et al., 2016), infecções virais causadas pelo HIV (WANG et al., 2017), Herpes Zoster (YAVARIAN et al., 2015), hepatite (TANG, et al., 2016) ou infecções causadas por parasitas como o <i>Toxoplasma gondii</i> (HAMDANI et al., 2017) poderiam alterar a programação do desenvolvimento neural predispondo o indivíduo a SCZ. Nascimento prematuro ou de conceptos com baixo peso (< 2,400 kg), traumatismos pré, peri e pós-natal como sofrimento fetal, trabalho de parto prolongado, ruptura prematura do saco gestacional, complicações com o cordão umbilical também aumentam o risco de SCZ. (BYRNE et al., 2007; MORGAN et al., 2012).</p>
Fatores sócio-ambientais	<p>O sono de baixa qualidade está associado a perdas neuronais, devido à redução na síntese de melatonina, promovendo redução da memória e aprendizado (ANDORKO et al., 2017). A poluição ambiental com metais pesados contamina os alimentos os quais são consumidos pela gestante e esses metais irão afetar a formação cerebral do feto de forma irreversível, como também as camadas de neurônios. Estas crianças apresentarão rendimento escolar baixo, baixa autoestima e fazendo com que, quando adolescente, tenham mais fatores coadjuvantes para a eclosão da doença predisposta (BROWN, 2011). Crianças que passam períodos longos de estresse pessoal ou familiar, podem ter transtornos esquizofrênicos ao longo de sua vida ou tornar-se um adulto esquizofrênico porque o cérebro ainda em formação, exposto a estresse de longo período, tem sua formação alterada no sistema límbico o qual compreende estruturas cerebrais responsáveis por comportamentos sociais, afetivos, sexuais, aprendizagem, memória e motivação (SHIRAKAWA; CHAVES & MARI, 2015).</p>

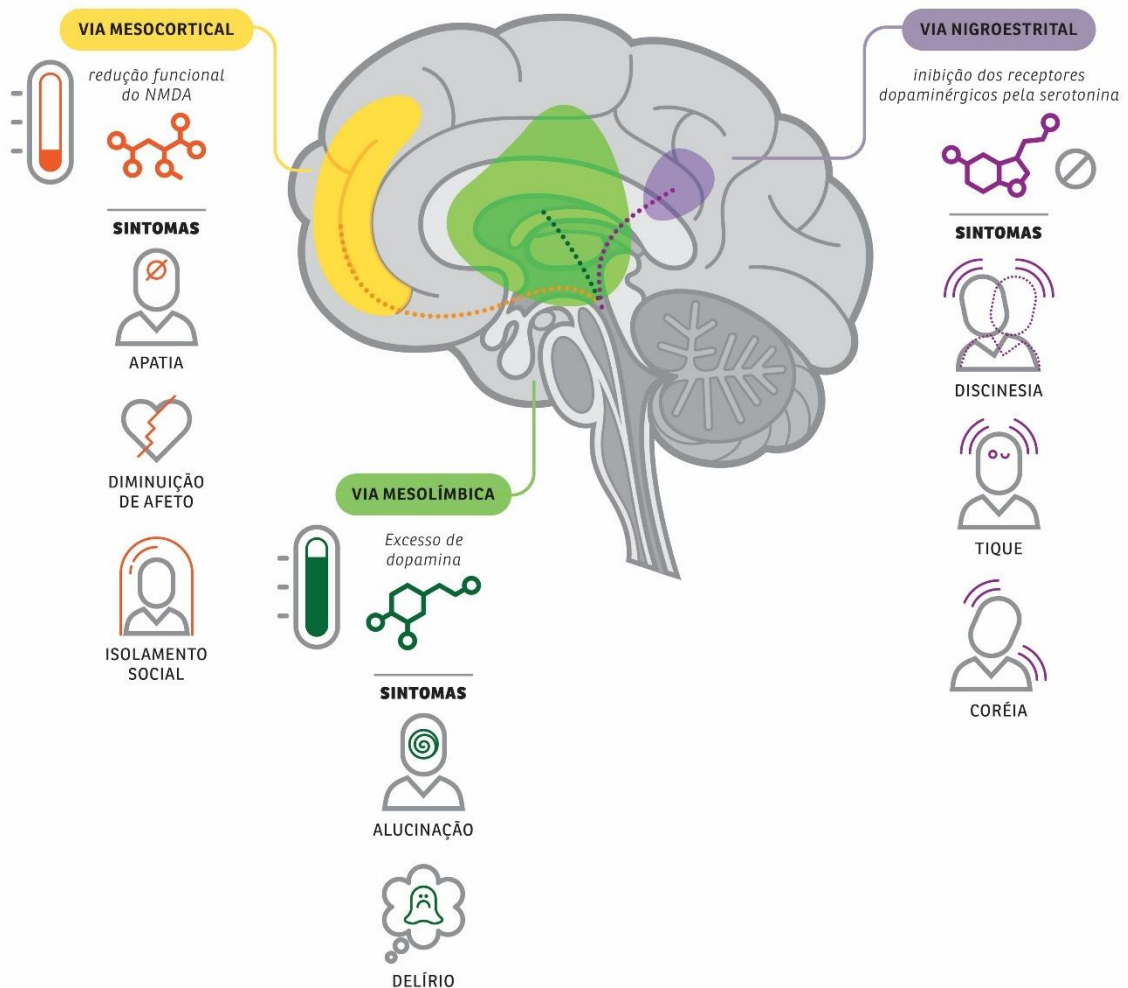
Figura 3: Hipótese neurobiológica dopaminérgica da SCZ



Fonte: O autor

Esta hipótese sugere que os efeitos positivos da SCZ estão associados com o aumento nos níveis de dopamina (DA) na região mesolímbica (A). Já os sintomas negativos são resultado direto de baixa quantidade de DA no tronco cerebral que leva a uma atividade baixa do córtex frontal (B).

Figura 4: Síntese das hipóteses neurobiológicas da SCZ



Fonte: O autor

1.4 TERAPEUTICA NA SCZ

A SCZ está intimamente associada a sintomatologia psicótica, que também pode estar presente em outras doenças psiquiátricas como o transtorno bipolar. Diante do que está relatado em estudos prévios, postula-se que a fisiopatologia da SCZ é explicada pela combinação de hiperfunção da dopamina e hipofunção do glutamato no sistema neuronal, juntamente com um envolvimento dos receptores da serotonina (5HT_{2A}) e um desbalanço entre esses receptores com os receptores

dopamínicos (D2) (GABBARD, 2016). Desse modo, o controle de surtos psicóticos implica em múltiplas abordagens, incluindo medicamentos e intervenções psicossociais, sendo o tratamento de escolha o uso dos antipsicóticos (AP) (TANDON; NASRALLAH; KESHAVAN, 2010; SADOCK; SADOCK & RUIZ, 2017).

O tratamento farmacológico é o principal alicerce para o controle das crises e para a prevenção de surtos esquizofrênicos e na psicose associada à outros transtornos psiquiátricos. A medicação prescrita deve ser administrada de modo continuado a fim de atenuar os sintomas psicóticos (GABBARD, 2016; GALLING et al., 2017).

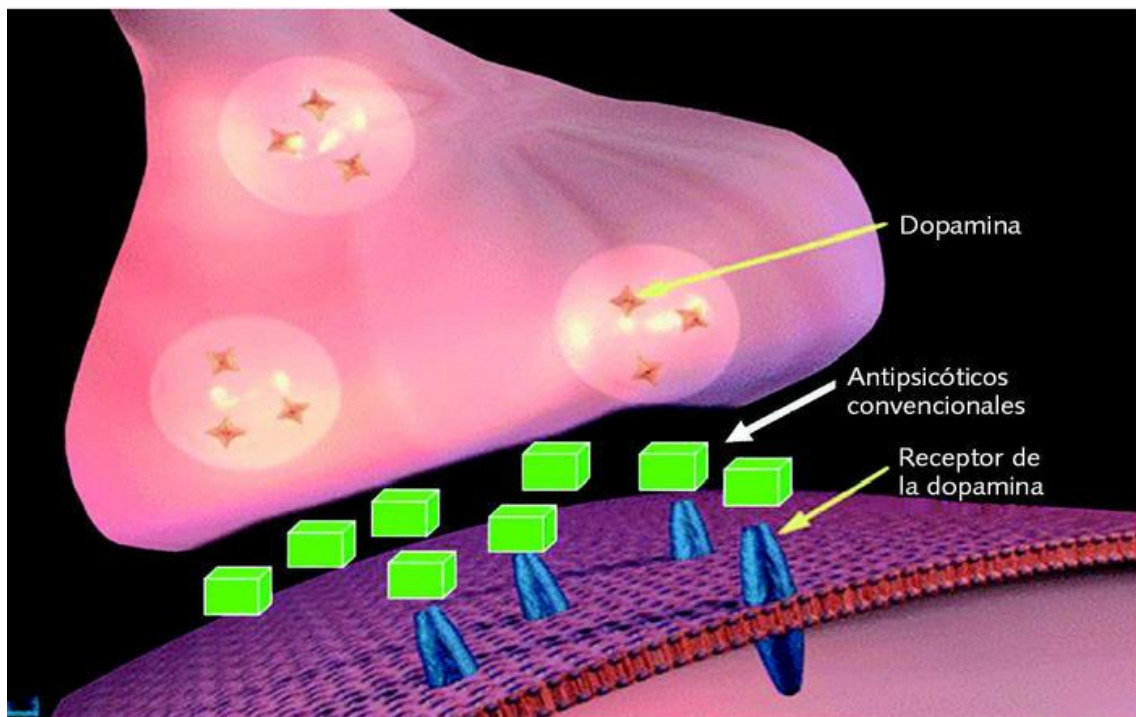
1.4.1 Antipsicóticos (AP)

Os fármacos AP, também chamados de neurolépticos, foram descobertos em 1952 e são utilizados para várias neuropatologias como a SCZ, episódios de mania, psicoses orgânicas, transtornos comportamentais e violência impulsiva, possuindo assim um fundamental papel no processo de desinstitucionalização ou seja, possibilitam a reabilitação de pacientes em estado crônico que durante décadas viveram em manicômios (MUESER & MCGURK, 2004; BRASIL, 2013; CORDIOLI; GALLOIS & ISOLAN, 2015). Os AP dividem-se em dois grupos distintos: típicos ou de primeira geração (APGs) e atípicos ou de segunda geração (ASGs) (GABBARD, 2016).

Os APGs estão associados à melhora de sintomas positivos como delírios e alucinações, porém acarretando em uma série de efeitos adversos como sintomas parkinsonianos agudos e crônicos como distonias e discinesias tardias e no desenvolvimento de sintomas negativos e depressivos (BRESSAN et al., 2002; KOSTER; CARBON & CORRELL, 2014), os quais podem ser tratados com fármacos anticolinérgicos (BRASIL, 2013; KATZUNG & TREVOR, 2017).

Os APGs têm maior afinidade pelos receptores dopaminérgicos D2, agindo ao nível dos receptores D2 pós-sinápticos da dopamina, sendo que o bloqueio pós-sináptico destes receptores está relacionado à melhora dos sintomas psicóticos e cognitivos (MISHARA & GOLDBERG, 2004; GALLING et al., 2017), conforme figura 5.

Figura 5: Mecanismo de ação dos antipsicóticos de primeira geração (APGs)



Fonte: Adaptado de Carbon & Correll (2014).

O bloqueio desses receptores no núcleo estriado determina o surgimento de sintomas parkinsonianos agudos, os chamados sintomas extrapiramidais (SEP), além de sintomas crônicos, tais como distonias e discinesias tardias, comprometendo a adesão do paciente ao tratamento. Adicionalmente, o bloqueio dopaminérgico frontal está associado ao desenvolvimento de sintomas negativos e depressivos (BRESSAN et al., 2002; CORDIOLI; GALLOIS & ISOLAN, 2015).

Os APGs são classificados em fenotiazinas (como exemplo a clorpromazina), butirofenonas, difenilbutilpiperidinas, tioxantenos e benzamidas substituídas, representados pela clorpromazina, haloperidol, flupentixol, fluspirileno, sulpirida, levomepromazina, clorprotixeno, entre outros (LÜLLMANN; MOHR & HEIN, 2017).

Os ASGs fazem parte do arsenal terapêutico a partir dos anos 90 do século passado, agem via antagonismo do receptor D2 de dopamina, e com maior afinidade do receptor 5-HT-2A de serotonina, apresentando uma melhora nos chamados sintomas negativos da SCZ como o isolamento social, apatia, indiferença emocional e pobreza de pensamento (HILAL-DANDAN & BRUNTON 2016).

Esses efeitos benéficos ocorrem pela atividade desses fármacos nas vias nigroestriatal e mesocortical (RANG, 2016). Adicionalmente, induzem menos

efeitos extrapiramidais como a acatisia (transtorno de movimento relacionado ao sistema motor e caracterizado por sensação subjetiva de inquietude interna, irritabilidade ou disforia que podem ser intensas) e parkinsonismo (SILVA, 2010).

ASGs induzem menor risco de SEP e de discinesia tardia, porém seu uso à longo prazo pode induzir distúrbios metabólicos, como o aumento de peso, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, hiperglicemia e síndrome metabólica, oferecendo um maior risco de mortalidade por eventos cardiovasculares que os APGs. Como já foi dito anteriormente, os ASGs não são uma classe homogênea em relação à tolerabilidade e segurança, e isso reflete-se também no perfil de risco de eventos adversos metabólicos (ELKIS et al, 2008).

Os ASGs são caracterizados pela baixa incidência de efeitos adversos extrapiramidais (CASTRO & ELKIS, 2007; MELTZER et al., 2010). Seu mecanismo de ação consiste no efeito antagonista aos receptores dopaminérgicos D2, possuindo uma maior afinidade aos receptores serotoninérgicos e sua eficácia acaba por mostrar a importância de sistemas não dopaminérgicos no tratamento de transtornos psicóticos.

Os fármacos representantes dos ASGs incluem, clozapina, olanzapina, quetiapina, risperidona, amisulprida, aripiprazol, sertindol, zotepina e a ziprasidona (HILAL-DANDAN & BRUNTON 2016; KATZUNG & TREVOR, 2017).

1.4.2 Efeitos adversos de AP

A SCZ é um dos transtornos mentais mais debilitantes em todo mundo e os pacientes portadores dessa doença geralmente apresentam-se acima do peso e com diversos distúrbios metabólicos relacionados à obesidade. Além disso, esses pacientes tem uma expectativa de vida reduzida, onde 75% de todas as mortes em pessoas com SCZ são causadas por doenças cardiovasculares (BRESEE et al., 2011; HJORT et al., 2014; BROWN et al., 2010).

A prevalência de diabetes tipo 2 é aumentada duas vezes em pessoas com SCZ (HOLT & MITCHELL, 2015). Obesidade e Sobrepeso estão presentes em 40-60% dos indivíduos com SCZ e contribuem para altas taxas de morbidade e mortalidade (FILHO, 2006; ZORTÉA et al., 2009; BAKKER et al., 2010). Estudos indicam que a obesidade é duas a três vezes mais prevalente entre as pessoas com SCZ do que na população geral, além de alta prevalência de dislipidemias

(HENDERSON et al., 2005), e de fatores de risco independentes, como a hipertensão e tabagismo (ZORTÉA et al., 2009; HOLT & PEVELER, 2009).

As razões para o aumento da obesidade e sobrepeso em portadores de SCZ, estão relacionadas aos fatores ambientais, como a má alimentação e inatividade física, bem como a doença e os efeitos do tratamento farmacológico. Entretanto, também tem sido observado que o ganho de peso é um efeito adverso comum da medicação antipsicótica, afetando entre 15 e 72% dos pacientes (CITROME et al., 2011). A maior parte do ganho de peso ocorre no início do tratamento, com 37 a 86% dos que sofrem um primeiro episódio de psicose, também experimentando mais de 7% de ganho de peso em 12 meses (KAHN et al., 2011) ocorrendo com frequência dentro de 12 semanas do início do tratamento. Estudos observacionais a longo prazo sugerem que o ganho de peso continua por pelo menos 4 anos, embora a um ritmo mais lento (KINON et al., 2011).

Portadores de SCZ apresentam maior preferência para o consumo de uma dieta rica em gordura e carboidratos refinados, contendo menos fibra, frutas e legumes do que a da população em geral (MCCREADIE et al., 1998; GOSSAGE-WORRALL et al., 2016). A inatividade física, a privação social e urbana vivida por esquizofrênicos podem contribuir ainda mais para o aumento da obesidade (GODFREY & JULIEN, 2005; ELMAN; BORSOOK & LUKAS, 2006; GOSSAGE-WORRALL et al., 2016).

Os lipídios e seu metabolismo tem sido ligado a muitos distúrbios tanto somáticos (TANIGUCHI et al., 2013; ASSELIN et al., 2014; MISTNEFES et al., 2014) quanto neuropsiquiátricos, especialmente em portadores de SCZ (McEWEN & STELLAR, 1993; WEI et al., 2013; HAMAZAKI et al., 2013; YADAV et al., 2014). A relação biológica de distúrbios mentais e resposta ao estresse envolvem uma série de reações complexas e neurofisiológicas interativas no cérebro, com o sistema nervoso autônomo, o eixo adrenocortical (HPA), o sistema imune e a adesão plaquetária (PERRY & POLLARD, 1998; MAHADEVAN et al., 2017; COROMINAS-ROSO et al., 2017). Uma desregulação no metabolismo lipídico pode ser particularmente importante para o desenvolvimento de danos e distúrbios no SNC devido sua alta concentração lipídica praticamente próxima às concentrações apresentadas no tecido adiposo (MÖSSNER et al., 2007).

Complicações metabólicas em pacientes portadores da SCZ também podem ser desencadeadas através de uma deficiência no estado das prostaglandinas que leva a uma hiperatividade da enzima fosfolipase A2. Nesse estado a quantidade de

ácido araquidônico (AAr) e eicosapentanóico (EPA) diminuem para níveis inferiores ao limiar da função de segundo mensageiro, já que a forma citosólica da fosfolipase A2 favorece cadeias acilo (EGGERS et al., 2012). A hiperatividade desta enzima é responsável pela depleção de AA e EPA na membrana celular levando ao aumento da produção de radicais livres e promotores de peroxidação e inflamação (RUBEŠA; GUDELJ & KUBINSKA, 2011).

Sumiyoshi e colaboradores (2011) relataram que pacientes esquizofrênicos com concentrações elevadas de ácidos graxos possuem uma pior resposta em tarefas de padronizadas por um roteiro previamente determinado, porém apresentam melhores resultados em sintomas positivos.

Um estudo no qual foi realizada a suplementação hormonal de dehidroepiandrosterona resultou na estabilização do índice de massa corporal (IMC), na circunferência de cintura e nos valores de glicemia em jejum de pacientes esquizofrênicos tratados com olanzapina (HOLKA-PORORSKA et al., 2015).

De acordo com a *Chinese Medical Association Diabetes Society* (2011) a melhor opção de tratamento para a SCZ tem sido o uso de fármacos antipsicóticos a longo prazo, contudo as manifestações de efeitos adversos como o ganho de peso, intolerância à glicose e piora no perfil lipídico tem sido amplamente relatadas, sendo que esses fatores estão fortemente associados às complicações cardiovasculares e à manifestação de diabetes. Esses efeitos adversos acabam sendo os principais fatores para que os pacientes desenvolvam a não-aderência ao tratamento, ocasionando um grande desafio aos psiquiatras em compreender esses riscos e monitorar parâmetros metabólicos nos pacientes tratados com este tipo de medicação.

Estudo conduzido por Tang e colaboradores (2011) relata que a clozapina é um dos antipsicóticos mais utilizados e que apresenta maiores efeitos metabólicos.

Além disso, um estudo prospectivo de oito semanas buscou realizar o monitoramento dos níveis glicêmicos e lipídicos de 150 pacientes em estágio inicial de SCZ que ainda não haviam sido tratados em três grupos que passaram por administração isolada de olanzapina, quetiapina e aripiprazole. Os níveis glicêmicos nos pacientes tratados com olanzapina aumentaram consideravelmente em comparação aos outros antipsicóticos, sendo os níveis lipídicos encontrados em altas concentrações em pacientes que foram tratados com quetiapina e olanzapina. Porém o aripiprazole garantiu melhores níveis de lipoproteínas de alta densidade (HDL),

evidenciando possuir menor tendência no desenvolvimento de alterações no perfil lipídico em relação aos outros fármacos (ZHANG & LAN, 2014).

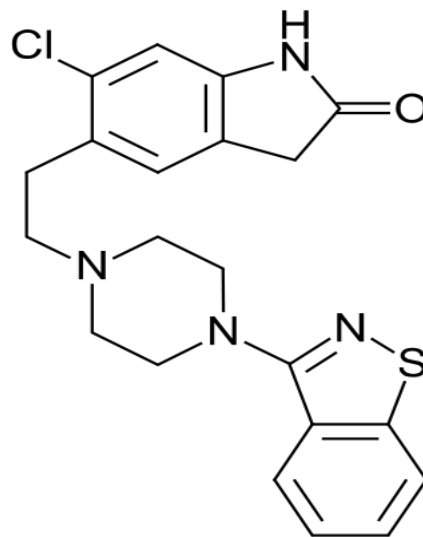
Alterações imunológicas presentes na SCZ estão relacionadas a um metabolismo prejudicado devido ao comprometimento na secreção de insulina e a presença de tecido adiposo excessivo frequentemente associado com síndrome metabólica, a qual produz elevados níveis de adipocinas, as quais foram implicadas na patogênese de doenças metabólicas incluindo diabetes, hipertensão e doenças cardiovasculares (GARCIA-RIZO, 2016; LEE et al., 2017). A fim de aumentar a eficácia e minimizar principalmente efeitos adversos, a pesquisa de novos fármacos AP ainda está sendo conduzida.

1.4.3 Cloridrato de ziprasidona

O cloridrato de ziprasidona (ZIP) é considerado o AP de mais recente comercialização no Brasil e em países desenvolvidos como os Estados Unidos. O seu uso no tratamento de psicoses presentes na SCZ e outras enfermidades psiquiátricas está associado a sua eficácia adicional sobre os sintomas negativos e baixo limiar de alguns efeitos adversos incluindo alterações na cognição, efeitos motores extra-piramidais e também disfunções neuroendócrinas encontrados em outros fármacos AP (SILVA, 2010).

Em termos químicos, a ZIP é um AP classificado como uma piperazina benzisotiazólica que apresenta uma fórmula molecular $C_{21}H_{21}ClN_4OS$, conforme figura 6, o qual apresenta limiar de efeitos adversos cognitivos, efeitos motores extra-piramidais e neuro-endócrinos e eficácia adicional sobre sintomas negativos da mesma maneira que a quetiapina, olanzapina, clozapina, sertindole, amisulprida e a risperidona, entre muitas outras substâncias novas em fase experimental (SILVA, 2010; GARETH, 2012).

Figura 6 – Estrutura química da ziprazidona



Fonte: Adaptado de Gareth (2012)

Possui uma alta afinidade a receptores dopaminérgicos centrais do tipo D_2 e pelos serotoninérgicos $5Ht_{2A}$, $5Ht_{1A}$, $5Ht_{1D}$, $5Ht_{2C}$, $5Ht_6$, $5Ht_7$, $5Ht_{10}$ e moderada ou baixa ação de bloqueio de receptação de serotonina e noradrenalina. Além disso, apresenta afinidade moderada por receptores histamínicos H_1 e muito baixa pelos muscarínicos M_1 , não garantindo ação em receptores *alfa-1* (α_1) e *alfa-2* (α_2) adrenérgicos, possuindo inicialmente como efeito adverso freqüente a sonolência, apesar de não ocasionar aumento de peso ou hipotensão postural (KOROLKOVAS & BURCKHALTER, 2013).

A ZIP diferencia-se dos outros ASGs por apresentar atividade agonista dos receptores serotoninérgicos $5HT_{1A}$ e inibir a recaptação de serotonina e noradrenalina, que lhe confere ainda efeitos ansiolíticos e antidepressivos (STIMMEL; GUTIERREZ & LEE, 2002).

No Brasil a ZIP é um fármaco registrado na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Ministério da Saúde (nº 105830772) para tratamento das seguintes enfermidades: tratamento da SCZ, transtornos esquizoafetivo e esquizofreniformes, estados de agitação psicótica e mania bipolar aguda, para manutenção da melhora clínica e prevenção de recidivas durante a continuação da terapia e tratamento de manutenção em pacientes com transtorno bipolar, em adultos;

tratamento de manutenção, em associação com lítio ou ácido valproico, em pacientes com transtorno bipolar tipo I.

Esse é um psicofarmacológico que está incluído na lista de Assistência Farmacêutica do Sistema Único de Saúde (SUS) sendo disponibilizado por meio do Componente Especializado da Assistência Farmacêutica (CEAF) para o tratamento de: SCZ, em especial a SCZ refratária.

As vias de administração da ZIP são orais e parenterais conforme o tipo de doença psiquiátrica. Em pacientes adultos esquizofrênicos a ANVISA orienta uso de uma dose máxima de 80 mg a cada 12 horas. Orienta-se também que este medicamento seja tomado junto com alimentos. Em pacientes com transtorno bipolar recomenda-se a dosagem de 40-80 mg duas vezes ao dia e combinado com lítio ou ácido valproico. Em crianças não existem estudos de eficácia e segurança para o uso deste fármaco e em idosos ≥ 65 anos a dose deve ser ajustada conforme o paciente (LABORATÓRIO FARMACÊUTICO DA MARINHA, 2015). No Brasil é comercializado como um medicamento genérico ou com o nome comercial Geodon®.

Em relação a sua farmacocinética, a ZIP possui meia vida de cinco a dez horas alcançando níveis plasmáticos estáveis de concentração em dois a três dias com pouca variabilidade entre a idade e o sexo dos pacientes (WILNER et al., 2000) e sua excreção é inferior a 5% pela urina e pelas fezes sem quaisquer modificações (RANG, 2016).

Após a sua metabolização ocorre a formação de quatro principais metabólitos da ZIP que foram detectados em estudos utilizando células microssomais hepáticas de seres humanos como o sulfóxido de benzotiazol piperazina, sulfonato de benzisotiazol piperazina, sulfóxido de ziprasidona e s-metildiidroziprasidona (MIAO et al., 2005; DARWISH et al., 2014).

É um fármaco lipofílico o qual deve ser administrado junto às refeições, por alta capacidade de absorção junto aos alimentos, permanecendo com sua farmacocinética inalterada quando usada concomitantemente com medicamentos antiácidos como cimetidina ou suspensões à base de hidróxido de alumínio e magnésio (KEFELIOĞLU et al., 2016).

Alguns estudos pilotos utilizando uma formulação de ação rápida a nível parenteral, mostrou sua eficácia com dosagens de 10 a 20 mg no controle de agitação de pacientes com sintomas agudos sem causar distonia e sedação (LESEM et al.,2001). Diferentemente de outros antipsicóticos atípicos, há relatos de que a ziprasidona não contribui no aumento de peso a médio e longo prazo (WETTERLING, 2001).

Apesar da ZIP possuir menor impacto sobre o sistema neuro-endócrino que leva a enfermidades metabólicas e cardiovasculares, estudos têm descrito efeitos adversos que são sintetizados na Tabela 2.

Apesar do número elevado de relatos de efeitos adversos associados ao uso da ZIP e outros antipsicóticos a ZIP possui um menor risco de obesidade, diabetes e outras doenças metabólicas (DIETRICH-MUSZALSKA; KOPKA & KWIATKOWSKA, 2013; RANG, 2016). Entretanto, estudos têm relacionado o uso da ZIP associado à resposta inflamatória e outros efeitos imunes indesejáveis como respostas alérgicas, urticária difusa (AKKAYA et al.; 2007) e reações de hipersensibilidade (KIM et al., 2014). Além disto, tem sido relatado que a ZIP possui efeito genotóxico em células mononucleares do sangue periférico (CMSPs) (KEFELIOĞLU et al., 2017), induzindo também aumento nos níveis de peroxidação lipídica plasmática (DIETRICH-MUSZALSKA; KOPKA & KWIATKOWSKA, 2013).

Tabela 2: Principais efeitos adversos da ziprasidona (ZIP)

Ocorrência	Principais sintomas
> 10% dos pacientes	SCZ: Sonolência (esquizofrênia); transtorno bipolar: Acatisia, tontura, síndrome extrapiramidal, dor de cabeça, sonolência, náusea
1 a 10%	SCZ: Agitação, insônia, acatisia (incapacidade de se manter quieto), tontura, distonia (contração involuntária lenta e repetida da musculatura), síndrome extrapiramidal (síndrome que provoca falta de coordenação motora, desequilíbrio e perda do controle sobre o movimento muscular), dor de cabeça, hipertonia (aumento da contração muscular), tremor, visão anormal, constipação (prisão de ventre), boca seca, dispepsia (má digestão), aumento da salivação, náusea, vômito, astenia (fraqueza). Transtorno bipolar: Distonia, hipertonia, tremor, visão anormal, constipação, astenia
Distúrbios imune sistema	Reações alérgicas: dermatites, erupções cutâneas; eosofilia; sintomas inflamatórios sistêmicos, febre, hepatite, nefrite, pneumonite, miocardite, pericardite
Distúrbio nervoso sistema	Paralisia facial, síndrome neuroléptica maligna (grupo de manifestações clínicas que inclui rigidez muscular grave, alteração do nível de consciência; aumento da temperatura corporal (38-41°C), taquicardia e insuficiência renal e pode ser fatal, síndrome serotoninérgica (grupo de manifestações clínicas que inclui alterações do estado mental como ansiedade, agitação, confusão, inquietação, letargia (cansaço e lentidão de reações e reflexos), euforia, alucinações e até coma; alterações motoras como tremores, contração involuntária dos músculos, incoordenação; e outras, calafrio, sudorese (suor aumentado), discinesia tardia (movimentos involuntários, principalmente dos músculos da boca, língua e face, ocorrendo exteriorização da língua com movimentos de um canto a outro da boca).
Distúrbios cardiovasculares e vasculares	Taquicardia, torsade de pointes (arritmia cardíaca); hipotensão postural, síncope, tromboembolismo venoso hipertensão, síncope
Distúrbios gastrointestinais	Disfagia, inchaço da língua, hipersalivação (aumento da produção de saliva), náusea, vômitos, diarreia (aumento no número de evacuações com fezes líquidas), câimbras abdominais (cólicas)

Fonte: (Adaptado do Laboratório Farmacêutico da Marinha, 2015; Katzung & Trevor, 2017).

1.5 O METABOLISMO OXIDATIVO ASSOCIADO À SCZ

Alterações no metabolismo oxidativo têm sido associadas a doenças psiquiátricas, incluindo também sintomas como a psicose. Por exemplo, a SCZ apresenta uma fisiopatologia complexa que abrange não só as alterações à nível dos neurotransmissores, referidos na etiologia da SCZ, mas outras rotas etiológicas como o processo oxidativo (KOGA et al., 2015; OWEN; SAWA; MORTENSEN, 2016), inflamatório (SIROTA et al., 2015; OWEN; SAWA & MORTENSEN, 2016), dentre outros.

Vários parâmetros relacionados à patogênese da SCZ, como idade na fase inicial da doença, gravidade dos sintomas, presença de sintomas negativos e subtipo da doença, estão associados com o nível de estresse oxidativo e não apenas com a presença da doença em si, embora não exista evidência em relação ao tempo de doença (PAZVANTOGLU et al., 2009; SHIRAKAWA; CHAVES & MARI, 2015).

Em relação ao metabolismo oxidativo, o organismo produz constantemente espécies reativas de oxigênio (EROs) geradas como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical superóxido ($O_2^{\bullet -}$), radicais hidroxila (OH^{\bullet}). Também produz espécies reativas de nitrogênio (ERNs) incluem o óxido nítrico (ON) e peroxinitrito ($ONOO^{\bullet}$) (NORDBERG; ARNER, 2001; DO et al., 2009). Em níveis baixos e controlados muitas destas moléculas são importantes sinalizadoras de rotas metabólicas celulares. As concentrações basais das EROs são importantes para a manutenção da homeostase do organismo, pois o H_2O_2 e o ON atuam como sinalizadores celulares de proliferação, migração, sobrevivência e diferenciação celular (MACHADO, 2015).

Entretanto, a elevação nos seus níveis pode gerar o que se conhece como “estresse oxidativo”. Assim, para controlar os níveis de EROs e ERNs existem vários mecanismos celulares de defesa antioxidante existentes para compensar a produção de EROs e ERNs, incluindo vias enzimáticas e não enzimáticas (NORDBERG & ARNER, 2001). A via enzimática é representada pela enzima superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GSH-Px), catalase (CAT) e os antioxidantes não enzimáticos que incluem glutatona (GSH), ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E), carotenóides e flavonóides (DO et al., 2009; YAO & KESHAVAN, 2011; MAGALHÃES et al., 2016).

A SOD catalisa a conversão de $O_2^{\bullet -}$ em H_2O_2 . Tanto a CAT como a GSH-Px convertem o H_2O_2 em água e oxigênio. O GSH reduzido é oxidado por GSH-Px a GSH

oxidado. A GSH-Px também converte o nitrato em nitrito. O nitrito é frequentemente utilizado como um marcador para a atividade de ON. Os radicais hidroxila, produzidos a partir de H_2O_2 e ON, promovem apoptose, danos ao ácido desoxirribonucléico (oxDNA), carbonilação de proteínas e peroxidação lipídica. A vitamina E agindo como antioxidante, pode inibir a peroxidação lipídica. Por sua vez, os radicais de vitamina E resultantes podem ser reciclados pela ação da vitamina C. As substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) como o malondialdeído (MDA) são produtos finais importantes da peroxidação lipídica (FLATOW; BUCKLEY & MILLER, 2013).

As lesões no DNA são uma constante na SCZ (ŞİMŞEK et al., 2016; CALABRESE et al., 2017). Eventos químicos que levam a estes danos incluem hidrólise, oxidação e ataques eletrofílicos (alquilações) à cadeia do DNA (MARNETT & PLASTARAS, 2001).

A bioquímica celular normal promove espécies que podem ocasionar danos no DNA através de quebras (simples ou duplas), danos álcali-lábeis, *crosslinks* e quebras resultantes de reparo por excisão. As EROs provocam no DNA danos nas bases nitrogenadas, purínicas e pirimidínicas, no açúcar desoxirribose e nas ligações cruzadas DNA-proteína. Estas lesões estão associadas à formação de mutações e perda da integridade do DNA (GOETZ e LUCH, 2008; VESKOUKIS, TSATSAKIS e KOURETAS, 2011; ALI et al., 2017).

As principais alterações no DNA ocorrem quando o radical hidroxil reage com a ligação dupla C5-C6 das pirimidinas formando timina ou citosina glicóis. Quando o excesso de hidroxila ($HO\bullet$) e oxigênio singlete (1O_2) atinge a base guanina, esta se transforma em uma base modificada a 8-Oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina (8-oxodGuo), que é um marcador da oxidação do DNA (DONE 2006; DI MINNO et al., 2017).

As células do sistema nervoso central (SNC) são mais vulneráveis aos efeitos tóxicos das EROs do que as de outros órgãos do corpo, pois o mesmo apresenta uma alta taxa de atividade metabólica oxidativa, alto consumo de oxigênio, baixos níveis de enzimas antioxidantes protetoras, uma área extensa de superfície da membrana que envolve um grande volume citoplasmático do neurônio e uma rede anatômica neuronal vulnerável à ruptura. A alta proporção de ácidos graxos poliinsaturados de membrana facilmente oxidáveis (PUFAs) e presença de metais redox-ativos como o íon cobre (Cu^{+2}) e íon ferro (Fe^{+2}) promovem a formação de moléculas altamente instáveis (DO et al., 2009; PADURARIU et al., 2010).

Quando ocorre estresse oxidativo as células podem apresentar alterações citofuncionais, incluindo na produção dos neurotransmissores associados à SCZ, como a dopamina e o glutamato. Assim, a falha das defesas antioxidantes para proteção contra a geração destas espécies resultará em danos oxidativos de lipídios, proteínas, carboidratos, enzimas celulares e DNA, com a conseqüente disfunção que pode afetar a neurotransmissão e, em última análise, exacerbar a sintomatologia da SCZ (YAO & KESHAVAN, 2011).

Na realidade, existem neurotransmissores auto-oxidáveis, como a dopamina, epinefrina e norepinefrina, que podem gerar grandes quantidades de H_2O_2 , enquanto que a disfunção de mitocôndrias neuronais pode também gerar níveis elevados de $O_2^{\bullet-}$ (HALLIWELL, 2001; FLATOW; BUCKLEY & MILLER, 2013). Evidências têm mostrado que pacientes portadores de SCZ, desde o início da doença e antes de qualquer protocolo de tratamento, apresentam aumento no estresse oxidativo e peroxidação lipídica e baixos níveis das enzimas antioxidantes e da capacidade antioxidante total quando comparados a controles saudáveis. Essa condição piora com o aumento da idade, tabagismo, escolaridade, estilo de vida, e nos estágios crônicos da SCZ, (MICÓ et al., 2011).

Já a redução nos níveis das enzimas antioxidantes especialmente da SOD, tem sido associada com a ocorrência dos sintomas positivos da SCZ em pacientes não tratados. Entretanto, o tratamento com alguns psicofármacos, como o haloperidol pode aumentar os níveis desta enzima antioxidante (FENDRI et al., 2006).

A produção de EROs na SCZ pode ser gerada pela hiperatividade da transmissão dopaminérgica no receptor D2 (ZHUO et al., 2017), onde o metabolismo enzimático da dopamina acarrete a geração de H_2O_2 através da auto-oxidação da dopamina que resulta na produção dopamina quinonas e $O_2^{\bullet-}$ (BOŠKOVIĆ et al., 2011). Essas EROs podem interagir com SOD e glutathione, gerando redução nos níveis dos antioxidantes disponíveis (BITANIHIRWE & WOO, 2011, MAGALHÃES et al., 2016).

Apesar de estar postulado que alterações no metabolismo oxidativo estão associados a SCZ, e em especial a psicose, estudos envolvendo o estresse oxidativo e ação dos antioxidantes ainda são discordantes, talvez em virtude da complexidade envolvendo a SCZ (SAWA & SEDLAK, 2016). Huang e colaboradores verificaram que não houve diferença significativa dos níveis séricos de substâncias reativas ao TBARS após quatro semanas de tratamento de antipsicóticos, incluindo

clorpromazina, haloperidol, risperidona e clozapina entre pacientes esquizofrênicos e indivíduos saudáveis (HUANG; LIOU & LIN, 2010).

A pesquisa realizada por Chittiprol e colegas (2010) através da mensuração dos níveis de neoptertina, um nucleotídeo de purina, mostrou que o tratamento com os antipsicóticos levou ao aumento significativo dos níveis de antioxidantes sugerindo que o uso de antipsicóticos poderia diminuir o estresse oxidativo e modular a expressão de enzimas antioxidantes. Outro estudo comparativo realizado por Ali e colaboradores (2017), utilizando soro de pacientes esquizofrênicos (ambos os sexos) e controles comparou os níveis de marcadores oxidativos como TBARS, metaloproteinases da matriz 9 (MMP-9) e marcadores inflamatórios como a interleucina 6 (IL-6), o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e a proteína c reativa (CRP) entre os dois grupos. Os resultados mostraram que os pacientes portadores de SCZ apresentaram níveis elevados destes marcadores oxidativos em relação ao grupo controle. Entretanto esta associação foi mais forte nos pacientes do sexo masculino onde foi encontrado níveis elevados de MMP-9 e fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), sugerindo assim que a SCZ também possui o sexo como fator determinante para o nível de intensidade da doença.

1.5.1 O papel do polimorfismo Val16Ala-SOD2 na SCZ

A teoria do neurodesenvolvimento da SCZ tem sugerido que níveis elevados de EROs e diminuídos da enzima superóxido dismutase dependente de manganês (MnSOD ou SOD2) poderiam estar associados com o desenvolvimento dessa doença. Para testar esta hipótese, alguns grupos de pesquisa têm investigado a associação entre o risco de SCZ e um polimorfismo pontual localizado no gene humano da SOD2 (rs4880).

A SOD2 é uma enzima que atua na dismutação do ânion $O_2^{\bullet -}$ - em H_2O_2 no interior da mitocôndria. Esta organela é a que mais produz $O_2^{\bullet -}$ - via escape de elétrons durante as reações mitocondriais, em especial a cadeia fosforilativa relacionada a produção do ATP a partir de glicose e oxigênio. Neste processo, cerca de 5% do oxigênio perde dois elétrons na última camada e se transforma no $O_2^{\bullet -}$ - que é uma ERO. Essa ERO é então substrato da enzima GSH-Px que também atua dentro da

mitocôndria para transformar o H_2O_2 em água e oxigênio (revisão em BRESCIANI et al., 2013).

Como a SOD2 é uma enzima produzida a partir de um gene nuclear, inicialmente é sintetizada uma proteína SOD2 inativa que possui uma sequência peptídica *Mitochondrial Target Sequence* (MTS) que direciona a proteína para a membrana interna mitocondrial onde a enzima torna-se ativa. O polimorfismo ocorre no códon 16 da sequência MTS levando a substituição de uma valina por uma alanina que, modifica a conformação proteica da SOD2. Como a SOD2 produzida pelo alelo valina tem a forma de beta-lamina, ela fica parcialmente retida na membrana interna mitocondrial e este fenômeno faz com que a enzima seja menos eficiente. Por outro lado, a presença da alanina faz com que a proteína SOD2 possua uma forma alfa-hélice permitindo a entrada fácil da mesma para o interior da mitocôndria. Estima-se que o genótipo alanina-alanina (AA) produza uma enzima 40% mais eficiente que o genótipo homozigótico valina-valina (VV) (BRESCIANI et al., 2013, 2015).

Ao contrário do que se possa pensar, a maior eficiência da enzima relacionada ao genótipo AA não é benéfica a célula e ao organismo. Isto porque, o aumento dos níveis de H_2O_2 não são acompanhados pelo aumento da GSH-Px. Como o H_2O_2 é mais solúvel em membranas, o excesso desta ERO extravasa para o citoplasma, onde reage com ions metais como o cobre e zinco (reação de Fenton) produzindo hidroxila ($OH\cdot$). Ao contrário do $O_2\cdot^-$ e H_2O_2 , a $OH\cdot$ não possui enzimas específicas que a catalisem, apenas o sistema antioxidante exógeno consegue neutralizá-la, e por também ser uma molécula altamente reativa o aumento nos seus níveis pode causar danos extensivos a célula, em especial ao DNA. O radical $OH\cdot$ tem alta afinidade com o DNA causando quebras e mutações. Por este motivo, estudos epidemiológicos têm descrito associação entre alguns tipos de câncer (mama, próstata, pulmão) com o genótipo AA (BRESCIANI et al., 2015).

A associação entre estresse oxidativo e SCZ tem subsidiado estudos voltados a elucidar o papel de moléculas antioxidantes ou pró-oxidantes específicas neste desbalanço superóxido-peróxido (S-HP). Um estudo conduzido por Michel et al (2004) avaliou a potencial associação entre a SOD2 e a superóxido dismutase dependente de zinco (ZnSOD ou SOD1) em tecidos cerebrais *post-mortem* de pacientes com SCZ e controles. Os níveis da SOD1 e SOD2 estavam significativamente elevados no córtex frontal e na substancia inominata nos pacientes com SCZ. Nas demais áreas cerebrais, os níveis destas enzimas foram similares entre os dois grupos.

O papel dos níveis da SOD2 na SCZ tem sido previamente investigado. Zhang et al (2013) relataram associação entre níveis baixos desta enzima e declínio cognitivo em pacientes esquizofrênicos, principalmente do sexo masculino. Uma investigação conduzida por Reyazuddin et al (2014) também descreveu níveis menores das enzimas SOD e GSH-Px em pacientes esquizofrênicos em relação a um grupo saudável.

Zhang et al (2014) também relataram associação negativa entre os níveis séricos do BDNF e plasmáticos da enzima SOD em pacientes com SCZ. Já, comparado com o grupo controle, os pacientes esquizofrênicos apresentaram níveis reduzidos de BDNF e da SOD, e níveis aumentados de lipoperoxidação medida pela concentração plasmática do MDA.

Apesar da ocorrência de associação entre níveis da SOD2 e SCZ, o conjunto dos estudos previamente realizados incluídos na meta-análise feita por Wang e colaboradores (2015) sugeriu que não existiria uma associação entre o risco propriamente dito de SCZ e o polimorfismo valina-16-alanina da SOD2 (Val16Ala-SOD2). Entretanto, outros estudos têm associado este polimorfismo com alguns sintomas da SCZ. Por exemplo, o estudo conduzido por Zhang e colaboradores (2014) relatou que, apesar de não ter sido encontrada associação entre risco de SCZ e o polimorfismo Val16Ala-SOD2, pacientes esquizofrênicos portadores do alelo A apresentaram pior performance cognitivo (principalmente relacionada a atenção) do que os que apresentavam o genótipo VV. Como o tabagismo é altamente associado a SCZ, uma outra investigação conduzida por Zhang et al (2016) também descreveu associação entre a presença do alelo A e início precoce do hábito de fumar. Por outro lado, Liu et al (2010) descreveram menor quantidade de sintomas negativos da SCZ e o alelo A.

Apesar de um número maior de estudos, a associação entre o polimorfismo Val16Ala-SOD2 e sintomas de discinesia tardia (DT) tem sido controversa. Por exemplo, Hori et al (2000) observou associação entre DT e o genótipo VV, sugerindo que o alelo A poderia conferir algum nível de proteção em relação ao aparecimento deste sintoma. Outro trabalho, conduzido por Hitzeroth et al (2007) encontrou justamente um resultado contrário: o alelo V poderia conferir proteção em relação a presença e severidade da DT em pacientes esquizofrênicos. Já outras investigações não observaram associação entre DT e o polimorfismo Val16Ala-SOD2 (ZHANG et al, 2002; PAE et al., 2007; ZAI et al., 2010; LIU et al., 2010). Um outro estudo mostrou

que antipsicóticos atípicos, incluindo a ZIP foram capazes de restaurar os níveis destas enzimas antioxidantes e diminuir os níveis de peroxidação lipídica em ratos previamente tratados com haloperidol (PILLAI et al., 2007).

O conjunto desses resultados, indica que apesar da SOD2 possuir algum tipo de relevância na fisiopatologia da SCZ, em especial o polimorfismo Val16Ala-SOD2, é necessário esclarecer melhor o seu papel na doença e na sintomatologia já que, nos estudos prévios conduzidos existiam diversos tipos de fatores confundidores, quando se trata de estudos *in vivo*, em seres humanos. Por este motivo, investigações utilizando modelos experimentais *in vitro* podem auxiliar na elucidação de alguns aspectos controversos em relação a SOD2 e também em relação ao seu potencial efeito farmacogenético em relação a administração de fármacos antipsicóticos.

1.6 O METABOLISMO INFLAMATÓRIO NA SCZ

Outro mecanismo fisiológico de grande relevância e que está associado ao metabolismo oxidativo é a resposta imune inata. O sistema imunológico é o responsável por defender o organismo contra qualquer agente agressor e envolve a participação de componentes celulares e humorais. Nesse aspecto, existem as defesas inatas e as adaptativas. A defesa natural ou inata que é a primeira linha de defesa, compreende a ação de células, em especial monócito-macrófagos, (ABBAS; LICHTMAN & PILLAI, 2015).

Em geral, a resposta inflamatória inata serve para evitar a invasão de microorganismos e também quando existe algum nível de lesão corporal. Em ambas as situações as células mononucleares periféricas como os macrófagos que derivam dos monócitos e os linfócitos T possuem um papel de grande relevância. No caso de uma invasão microbiana, os macrófagos residentes no tecido conjuntivo emitem sinais que mobilizam macrófagos, linfócitos T e alguns granulócitos (em especial neutrófilos), que saem da corrente sanguínea e vão para o local da invasão. Na presença de microorganismo, os macrófagos passam a produzir citocinas inflamatórias como o interferon gama (IFN γ), a interleucina 1 β (IL-1 β) que, por sua vez estimula a produção de citocinas pró-inflamatórias, em especial a IL-6 e o TNF α . O aumento nos níveis destas citocinas permite a fagocitose e destruição tanto de microorganismos quanto de células danificadas no tecido injuriado. Quando o macrófago está produzindo níveis

elevados destas citocinas pró-inflamatórias, ele é reconhecido como um macrófago M1. Por ser um processo intenso, logo a seguir os macrófagos são polarizados e passam a produzir citocinas anti-inflamatórias como a interleucina 10 (IL-10) que irá atuar diminuindo os níveis de citocinas pró-inflamatórias e também induzindo a regeneração tecidual a partir da diferenciação das células-tronco adultas presentes no tecido infectado ou lesionado.

Portanto, o processo inflamatório é fundamentalmente agudo e altamente regulado, pois se os níveis inflamatórios forem mantidos por muito tempo, estes podem causar quebra da homeostase corporal predispondo o organismo a disfunções e doenças. Apesar da resposta inflamatória macrofagocitária não ocorrer dentro do SNC em decorrência da Barreira sangue-cérebro, no SNC existem células da micróglia que possuem função imune similar aos macrófagos. Este é o caso dos astrócitos que também produzem citocinas pró e anti-inflamatórias. Outro aspecto importante de ser comentado é que, as citocinas são moléculas relativamente pequenas, e, portanto, conseguem atravessar a Barreira sangue-cérebro. Deste modo, os níveis periféricos destas citocinas podem representar processos inflamatórios no SNC.

A SCZ tem sido associada a um processo inflamatório crônico. Os pacientes portadores desta patologia apresentam anormalidades no sistema imune, onde ocorre uma condição pró-inflamatória que conduz a uma neuroinflamação e, como consequência ocorre a manifestação dos sintomas psicopatológicos. A neuroinflamação corresponde a ativação de células da micróglia que são as células inflamatórias residentes no cérebro, podendo também envolver outras células linfoides que se infiltram no cérebro, especialmente no hipocampo e tem um papel importante na SCZ, principalmente durante os estados psicóticos (AGUIAR et al., 2010).

Diante disso, acredita-se que é por isto que mães que acabem sofrendo processos infecciosos durante a gestação teriam risco aumentado de filhos com SCZ (MEYER; FELTON & YEE, 2009).

O aumento dos níveis de mediadores inflamatórios a nível de SNC pode ocorrer por dois mecanismos: pode ocorrer devido a um comprometimento da Barreira sangue-cérebro ou migração de células do sistema imune para o SNC e sua posterior conversão em microgliócitos. Os microgliócitos são capazes de produzir citocinas e também de estimular outras células, como os astrócitos para produzi-las também (DEVERMAN & PATTERSON, 2009). Estudos cerebrais realizados através da

ressonância magnética, demonstraram a ocorrência de alterações estruturais no cérebro de doentes com SCZ, sugerindo uma vertente neurodegenerativa nesta patologia, podendo ser o processo pró-inflamatório um dos mecanismos responsáveis por esta degeneração (HILLEKE; HULSHOFF & KAHN, 2009).

A SCZ parece estar relacionada com um desequilíbrio nos níveis de citocinas, provocando redução das citocinas anti-inflamatórias como a interleucina 4 (IL-4) e IL-10 e aumento das citocinas pró-inflamatórias como interleucina 2 (IL-2), IL-6, interleucina 8 (IL-8), TNF α , IFN γ (ZHANG et al., 2004; CHASE et al., 2015), sendo a IL-6 demonstrada consistentemente (SAWA & SEDLAK, 2016). Adicionalmente, ocorre aumento de células Th1 e Th2 e da CRP. Já o aumento da CRP, um marcador de inflamação associado a infecções crônicas e condições inflamatórias, está associado a prejuízos cognitivos, mas não a sintomas psiquiátricos (AGUIAR et al., 2010; KOOLA, 2016).

Também já foi evidenciado níveis elevados de IL-1 β , citocina pró-inflamatória libertada por monócitos e macrófagos, no líquido cefalorraquidiano de doentes com SCZ não medicados (SODERLUND et al., 2009) e presença de monócitos e linfócitos T na circulação periférica destes pacientes (AGUIAR et al., 2010; DREXHAGE et al., 2010; CHASE et al., 2015). O líquido de pacientes esquizofrênicos apresenta elevados níveis de citocinas inflamatórias antes dos episódios psicóticos (KOOLA, 2016)

Níveis elevados de IL-6 podem desempenhar o papel de comprometimento cognitivo e servir como potencial biomarcador inflamatório da deterioração na SCZ (FRYDECKA et al., 2015). Esta diferença é acentuada em pacientes obesos, que apresentam maiores níveis de TNF α e IL-1 β (citocinas pró-inflamatórias) e redução de receptor antagonista de Interleucina 1 (IL-1ra) (citocina anti-inflamatória), em relação aos não obesos (SIROTA et al., 2015).

Existem indícios que a SCZ pode ser uma patologia autoimune pelo fato de parentes de esquizofrênicos apresentarem mais casos de doenças autoimunes diagnosticadas devido à presença de anticorpos no soro destes pacientes, pois é verificado que o estresse psicossocial pode contribuir para o início de doenças autoimunes ou afetar seu curso mediante o dano na regulação da reatividade imune (STROUS & SHOENFELD, 2006; COUTINHO & VINCENT, 2016).

A inflamação possui um papel vital e importante no envelhecimento físico acelerado relacionado a SCZ. Um estudo realizado por Lee e colaboradores (2017) investigou a relação entre níveis de marcadores inflamatórios com variáveis

demográficas e clínicas, no qual foi encontrado níveis plasmáticos elevados de TNF α e IL-6 em pacientes esquizofrênicos em relação a pacientes controle. Os autores ainda sugerem que estes níveis elevados nos pacientes esquizofrênicos poderiam estar fortemente associados com condições como depressão, co-morbidade física e mal-estar mental.

Outro estudo também relatou não só a presença de níveis séricos elevados de marcadores inflamatórios como IL-2, IL-6 e IFN γ e reduzido do antiinflamatórios como a IL-10, e também níveis elevados de hemoglobina glicada (HbA1c), assim como um desbalanço na relação de triglicédeos e lipoproteínas de baixa densidade (LDL), sendo possível associar a SCZ com processos inflamatórios e outras complicações como diabetes e uma gama de doenças cardiovasculares (BALŮTŠEV et al., 2017).

O estudo conduzido por Fang e colaboradores (2016), avaliou a qualidade do sono (tempo de sono total, eficiência do sono, latência de início do sono, contagem de atividade total, vigília após o início do sono, número de despertar e duração média do despertar) através da actigrafia em 199 pacientes esquizofrênicos internados. A inflamação foi medida através da concentração sanguínea de glóbulos brancos (GB) e neutrófilos, juntamente com a relação neutrófilos-linfócitos (NLR) e a relação plaquetas-linfócitos (PLR). Os resultados sugeriram que a melhora da qualidade do sono pode modular o estado de inflamação em pacientes com SCZ, pois o tempo total de sono foi negativamente associado com NLR e PLR, e a eficiência do sono foi negativamente associada com contagens de neutrófilos e NLR. A latência de início do sono, as contagens de atividade total, a vigília após o início do sono e o número de despertares foram positivamente associados com as contagens de GB e neutrófilos. O tempo médio de despertar foi positivamente associado com NLR e PLR (FANG et al., 2016).

O complexo do gene IL-1 tem sido implicado na etiologia da SCZ. A pesquisa realizada por Kapelski e colegas (2017) avaliou se o complexo do gene IL-1 está associado com susceptibilidade à SCZ na população polonesa através de um estudo familiar onde foram genotipados os genes de interleucina 1 alfa (IL-1 α) (rs1800587, rs17561, rs11677416), IL-1 β (rs1143634, rs1143643, rs16944, rs484306, rs1143623, rs1143633, rs1143627) e interleucina 1RN (IL-1RN) (rs419598, rs315952, rs9005, rs4251961) em portadores de SCZ. Os resultados encontrados apoiam a teoria de que o polimorfismo do gene do complexo da interleucina 1 (rs1143627, rs16944,

rs1143623, rs4848306 no gene IL-1 β e rs4251961, rs419598, rs315952, rs9005 no gene IL-1RN) estão envolvidos na patogênese da SCZ (KAPELSKI et al., 2017).

Outra importante ação da inflamação crônica é que a mesma tem sido diretamente relacionada com a deterioração cognitiva de pacientes esquizofrênicos. O estudo realizado por Hope et al (2015) relatou associação entre sintomas negativos e diminuição geral das habilidades cognitivas com marcadores inflamatórios (HOPE et al., 2015). Os processos inflamatórios também parecem afetar o volume cerebral de portadores de SCZ. Zhang e colaboradores (2016) quantificaram níveis de IL-1 β , IL-6 e IL-8 em amostras congeladas de córtex orbitofrontal de pacientes esquizofrênicos e observaram uma significativa redução na massa cinzenta e no giro frontal superior destes pacientes em relação ao grupo controle, sugerindo que tal redução em pacientes com SCZ é exagerada devido a um elevado estado pró-inflamatório nestes indivíduos (ZHANG et al., 2016).

1.6.1 O polimorfismo Val16Ala-SOD2 na modulação inflamatória

Como alterações oxidativas têm sido associadas à SCZ, estudos tem sugerido que o polimorfismo Val16Ala-SOD2 também parece atuar na modulação inflamatória. Uma investigação prévia conduzida por Duarte e colaboradores (2010) sugeriu que indivíduos hipercolesterolêmicos portadores do genótipo VV apresentavam níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias em relação aos demais genótipos. A influência deste polimorfismo no sistema imune foi corroborada pelo estudo *in vitro* conduzido por Montano e colaboradores (2012) sugerindo que CMSPs portadoras do genótipo VV possuíam níveis elevados de citocinas inflamatórias e níveis mais baixos da citocina anti-inflamatória IL-10.

Além disso, investigações complementares *in vitro* corroboraram a influência deste polimorfismo na modulação inflamatória por fármacos com o metotrexato (BARBISAN et al., 2014) e moléculas bioativas presentes nos alimentos como o resveratrol (CAPELETO et al., 2015). Um estudo recente do tipo ensaio clínico confirmou a presença de níveis elevados de citocinas inflamatórias em pacientes hipercolesterolêmicos que foram tratados durante 12 semanas com 20 mg diárias de rosuvastatina (DUARTE et al., 2016).

1.7 ZIPRASIDONA E O METABOLISMO OXIDATIVO-INFLAMATÓRIO

Estudos mais aprofundados sobre o papel da ZIP na modulação do metabolismo oxidativo e inflamatório ainda são bastante incipientes. Apesar da ZIP ser um antipsicótico que possui efeitos adversos atenuados em relação a ocorrência de doenças metabólicas como a obesidade e o diabetes tipo 2, investigações prévias têm sugerido que este antipsicótico aumenta os níveis de peroxidação lipídica (DIETRICH-MUSZALSKA et al., 2013). Um estudo adicional também relatou que a lipoperoxidação associada a exposição a ZIP poderia ser atenuada por polifenóis presentes em alimentos como na arônia, uma espécie de amora (*Aronia melanocarpa*) nativa da América do Norte (DIETRICH-MUSZALSKA et al., 2014).

Uma investigação realizada por Karapidaki et al (2011) sugeriu que a ZIP poderia causar dano citogenético através de troca de cromátides irmãs ocasionando mutações ou por quebras no DNA em culturas de CMSPs. Por outro lado, um estudo recente sugeriu que na presença de outros agentes oxidantes a ZIP, assim como outros antipsicóticos atípicos poderia ter algum nível de efeito antioxidante *in vitro* (SADOWSKA-BARTOSZ et al., 2016).

O número de estudos envolvendo ZIP e metabolismo inflamatório também é bastante reduzido. A partir de um protocolo *in vitro* observou-se que a ZIP, assim como a quetiapina e a perospirona foram capazes de inibir os níveis de ON de células ativadas da micróglia (BIAN et al., 2008). Entretanto, a ZIP não foi capaz de inibir os níveis de TNF α como observado em células tratadas com quetiapina e perospirona. Em adipócitos humanos expostos *in vitro* a diferentes antipsicóticos, a ZIP aumentou os níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-1B e TNF α (SARVÁRI et al., 2014).

Com base nesta revisão, apesar da relevância clínica e científica do tema foram identificados na literatura estudos sobre a potencial indução de resposta inflamatória pela ZIP e se a exposição à ZIP poderia interferir em marcadores oxidativo-inflamatórios do sangue.

1.8 EFEITO DE SUPLEMENTOS ALIMENTARES NA ATENUAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA DE FÁRMACOS ANTIPSICÓTICOS

Resultados obtidos através de estudos envolvendo animais e humanos dão suporte ao papel de diferentes compostos polifenólicos naturais na modulação da saúde mental incluindo a plasticidade neuronal, comportamento, humor controlado por ansiolíticos, propriedades antidepressivas e cognição. Estudos prévios demonstraram que exercício físico e fatores dietéticos podem afetar o desenvolvimento e a manutenção dos neurônios, bem como a proteção cerebral de danos associados à doenças neurológicas (DIAS et al., 2012 ; MEEUSEN, 2014). Chen, Mu & Kitts (2018) em seu trabalho buscaram a relação da caracterização de uma mistura fitoquímica com uma potencial modulação inflamatória através da extração de folhas de café pelo método de processamento de folhas jovens de chá verde japonês e de folhas maduras de chá preto. Os resultados mostraram que a propriedade anti-inflamatória dessa extração não era atribuída somente ao ácido clorogênico como também por leves interações entre moléculas bioativas da mistura.

Apesar de estar bem estabelecida a associação entre a inflamação crônica e o estresse oxidativo nas psicoses e na SCZ, estudos sobre a interferência de polifenóis na patobioquímica e patofisiologia destas condições, ainda são bastante incipientes. Entretanto, pesquisas sugerem que assim como o extrato de chá verde, outros alimentos funcionais poderiam ser benéficos para pacientes esquizofrênicos. Um estudo recente sugeriu que a atividade anti-inflamatória e antioxidante presente no suco de pomelo poderia diminuir o estresse oxidativo induzido pelo tratamento com aripirazole em camundongos (ZARGAR, AL-MAJED & WANI, 2018). Outros estudos relatando a suplementação com chá verde em ratos tratados com olanzapina atribuíram efeitos protetores contra a síndrome metabólica induzida por este antipsicótico (RAZAVI et al. 2018). Bruno e colaboradores (2017) também relataram a partir de um estudo aberto de oito semanas de tratamento que a suplementação polifenólica da bergamota poderia exercer melhorias nas funções cognitivas em pacientes com SCZ.

O número de investigações envolvendo a ação de polifenóis presentes em suplementos alimentares na modulação do apetite e em alterações glicêmicas associadas à administração de ASGs é ainda muito pequeno, porém existem uma grande quantidade de evidências desta ação em associação com outras moléculas

bioativas na regulação do metabolismo energético, do apetite e da glicose (ALKHALIDY et al., 2014 ; JAYARATHNE et al., 2017 ; CHENG et al., 2017). Por este motivo torna-se relevante explorar o desenvolvimento de matrizes químicas a partir da extração combinada de alimentos cotidianamente pelos seres humanos como estratégia de reverter, atenuar e prevenir alterações metabólicas e inflamatórias desencadeadas pelos ASGs.

1.8.1 A matriz química do guaraná como potencial agente farmacológico na modulação de efeitos colaterais de antipsicóticos atípicos

Apesar da eficácia no tratamento dos sintomas psicóticos, a administração crônica de fármacos de segunda geração está diretamente associada ao desencadeamento de efeitos adversos, entre os quais os mais notáveis são: aumento de peso, indução de diabetes tipo 2 associada a obesidade, indução de diabetes similar a diabetes do tipo 1 via apoptose celular das ilhotas pancreáticas com diminuição da produção de insulina e outros sintomas adversos cardiovasculares incluindo reações hipertensivas, miocardite, e eventos coronarianos. A extensa maioria destes eventos associa-se com o estabelecimento de processos oxo-inflamatórios crônicos periféricos observados tanto no sangue quanto no tecido adiposo. Apesar da ZIP possuir ação atenuada no desencadeamento destes efeitos adversos, outros sintomas colaterais também relacionados com resposta imunológica têm sido descritos em pacientes que ingerem este antipsicótico. Deste modo, é possível inferir que o consumo regular de suplementos ricos em algumas moléculas bioativas com ação anti-oxidante e anti-inflamatória poderia ser benéfico para pacientes psiquiátricos.

Estudos sugerem que determinados alimentos possuem na sua matriz química moléculas bioativas que poderiam atenuar muitos desses efeitos colaterais. Este é o caso do guaraná (*Paullinia cupana*), um fruto amazônico, cuja semente torrada é geralmente utilizada para produzir bebidas energéticas (SCHIMPL et al., 2013).

O pó torrado da semente de guaraná tem sido utilizado desde os tempos pré colombianos e posteriormente pelas populações ribeirinhas que habitam a região Amazônica. O guaraná é rico em cafeína (CAF), catequinas (CAQ) e outras metilxantinas possuindo assim diversas propriedades energéticas e antifadigantes.

Um estudo epidemiológico prévio realizado em nosso laboratório, observou que a população ribeirinha idosa que habitualmente ingeria guaraná mais de três vezes por semana apresentava menor prevalência de obesidade e outros indicadores de síndrome metabólica em comparação a idosos que nunca ingeriram por não gostarem da bebida (KREWER et al., 2011).

A principal matriz química do guaraná é formada por concentração elevada de CAF, contendo também outras metilxantinas importantes como é o caso da teobromina (TEO) e seu derivado sintético denominado pentoxifilina (PENT) (BITTENCOURT et al., 2013). Além disto o guaraná possui também uma concentração significativa de CAQs similares e também apresenta na sua transcriptômica a expressão das mesmas, como as encontradas em outros alimentos e fitoterápicos, como é o caso do chá verde (*Camellia sinensis*) (ANGELO & JORGE, 2007).

A CAF (1,3,7-trimetilxantina) é o psicoestimulante mais amplamente utilizado nos países ocidentais possuindo propriedades anti-inflamatórias, anti-oxidativas e anti-apoptóticas podendo estar presente nas formulações de chás, café, bebidas energéticas e suaves contendo cacau. (ULRICH et al., 2015; NG; OR & IP, 2015). Estudos demonstraram que em doses controladas, a CAF poderia contribuir para melhorar parcialmente as atividades diárias e a qualidade de vida de pacientes com doenças neurodegenerativas tais como esclerose lateral amiotrófica, doença de Huntington e Mal de Parkinson (KOLAHDOUZAN & HAMADEH, 2017).

A TEO é uma molécula considerada um agente imunomodulador não esteroide, cuja forma sintética PENT tem sido usada no tratamento de uma gama de doenças infecciosas, vasculares, e também em condições inflamatórias tanto em adultos quanto em crianças. Entre suas principais propriedades se destaca ação anti-inflamatória que resulta na inibição da fosfodiesterase do eritrócito reduzindo assim a viscosidade do sangue, melhora da microcirculação e da perfusão tecidual. Por ser inibidora da fosfodiesterase, esta molécula consegue regular negativamente a produção de citocinas pró-inflamatórias incluindo a IL-6, TNF α e IFN γ . Muitos estudos têm sido conduzidos mostrando que a TEO poderia reduzir efeitos negativos no diabetes (FERNANDO et al., 2017).

As CAQs quimicamente são pertencentes à família dos polifenóis e possuem uma forte ação antioxidante. Um estudo apontou que polifenóis presentes no chá verde podem atuar benéficamente em patologias como diabetes mellitus tipo 1,

cardiopatas, infecções virais, cancro, doenças neurodegenerativas e no processo de envelhecimento (HAN et al., 2004). Outro trabalho realizado com o extrato de chá verde com teor elevado em CAQs mostrou que em consumo regular, tais substâncias poderiam simultaneamente contribuir para a redução de gordura corporal e do perímetro da cintura. Ao fim de doze semanas o grupo que ingeriu maior quantidade de CAQs (583 mg) em relação ao grupo controle (96 mg) apresentou uma perda média de 1,7 quilos, obtendo uma redução da gordura abdominal em 2,5cm e da gordura visceral em 10,3cm³ (NAGAO, HASE & TOKIMITSU, 2007).

Acredita-se que a matriz principal do guaraná produzida pelas xantinas, CAF, TEO e pelos polifenóis, principalmente o guaraná seja responsável pelas suas diversas propriedades biológicas. Estudos relataram que o guaraná possui propriedades antioxidantes justificadas pela modulação dos níveis de NO em células embrionárias 3LT3 expostas ao nitroprussiato sódico (BITTENCOURT et al., 2013); reduz os níveis de LDL oxidado a partir de protocolos *in vitro* e *in vivo* (PORTELLA et al., 2013) e ação anti-inflamatória devido a redução de citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, TNF α e IFN γ) e aumento na IL-10, uma importante citocina anti-inflamatória (KREWER et al., 2014). A matriz química similar a base de CAF, TEO e CAQs também amplificou o efeito anti-inflamatório *in vitro* do Lítio em um estudo utilizando macrófagos ativados via inibição da enzima glicogênio sintase quinase 3 (GSK-3) (BARBISAN et al., 2017).

O efeito biológico da matriz química do guaraná produzida a partir de moléculas puras isoladas tem sido previamente testado em estudos que mostraram que a mesma foi capaz de diminuir a taxa de mortalidade de espermatozoides humanos no momento do seu descongelamento (WERNER et al., 2017). Outro estudo também descreveu que esta matriz química foi capaz de intensificar a resposta anti-inflamatória do modulador de humor lítio em macrófagos RAW 264.7 ativados pelo antígeno da fitohemaglutinina (BARBISAN et al., 2017).

HIPÓTESES

Estudos prévios têm relatado efeitos adversos da ZIP associados a função imune. Entretanto, não está bem esclarecido se o ZIP poderia desencadear de modo isolado a resposta inflamatória de células imunes, e se este efeito poderia ser influenciado por fatores genéticos e ambientais, como é o caso da dieta. Dentro deste contexto o presente estudo testou as seguintes hipóteses:

Hipótese 1

A ZIP desencadeia resposta oxidativo-inflamatória *in vitro* em macrófagos RAW 264.7

Hipótese 2

A possível resposta inflamatória associada a ZIP também ocorre em células mononucleares do sangue periférico (CMSPs) humano com intensidade dependente do desbalanço S-HP associado ao polimorfismo Val16Ala-SOD2.

Hipótese 3

A resposta inflamatória associada a ZIP em macrófagos RAW 264.7 é atenuada pela suplementação do meio de cultura com um composto formado por cafeína (CAF), teobromina (TEO) e catequina (CAQ) que mimetiza a matriz química principal do guaraná.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar o efeito *in vitro* da ZIP na resposta oxidativo-inflamatória de células imunes avaliando a potencial influência do polimorfismo genético Val16Ala-SOD2 e da matriz química do guaraná na mesma.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito da ZIP na indução da resposta inflamatória de células isoladas de macrófagos RAW 264.7 e CMSP humanos através da avaliação:
 - da taxa de proliferação celular
 - dos níveis dos marcadores oxidativos (ON, EROs e $O_2^{\bullet -}$)
 - da concentração proteica e expressão gênica das citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, $TNF\alpha$, $IFN\gamma$) e anti-inflamatória (IL-10)
- Avaliar o efeito do polimorfismo Val16Ala-SOD2 na resposta inflamatória e de estresse oxidativo da ZIP em CMSPs humanos através da análise de todos os parâmetros anteriormente citados incluindo a modulação de enzimas antioxidantes : SOD, Catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GSH-Px)
- Avaliar o efeito da matriz química do guaraná na modulação da resposta inflamatória e de estresse oxidativo desencadeada pela ZIP em macrófagos RAW 264.7 através da análise de todos os parâmetros previamente descritos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E CONDIÇÕES DE CULTIVO CELULAR

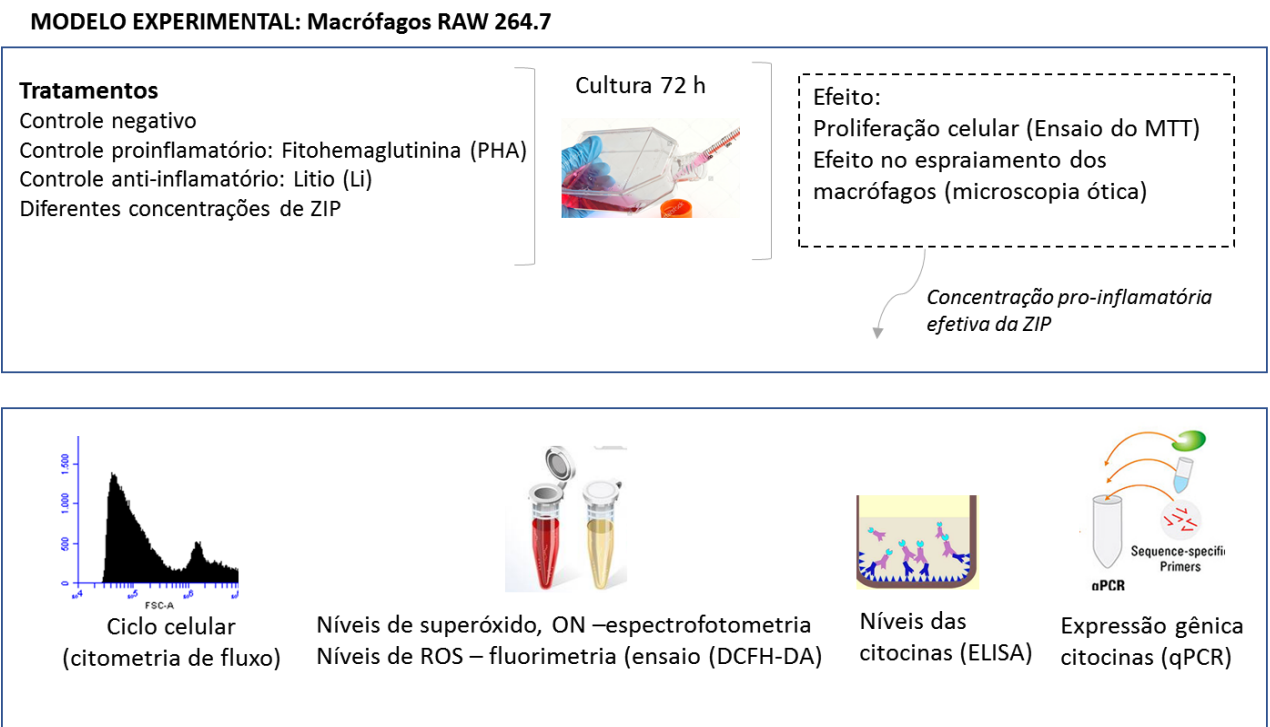
O presente estudo possui dois delineamentos experimentais *in vitro* que são complementares entre si, a fim de responder as hipóteses propostas.

3.1.1 Protocolo *in vitro*: 1

Efeito da ZIP na resposta inflamatória de macrófagos RAW 264.7

Foi realizado um estudo de caráter experimental *in vitro* a partir da utilização da linhagem celular RAW 264.7 (monócitos-macrófagos de camundongos) obtidas na *The American Type Culture Collection* (ATCC). O esquema geral do delineamento deste protocolo é apresentado na Figura 7.

Figura 7: Esquema geral do protocolo experimental 1: avaliação da indução da resposta inflamatória em macrófagos da linhagem RAW 264.7 expostas a ziprasidona (ZIP).



Fonte: O autor

Neste protocolo foi avaliada a possível ação pró- ou anti-inflamatória da ZIP (na concentração terapêutica de 75 ng/mL) e em concentrações equivalentes superiores (150 e 300 ng/mL) e inferiores (18,5 e 37,5 ng/mL) em macrófagos da linhagem RAW 264.7. Esse modelo experimental está baseado no estudo de Jung e colaboradores (2016), onde foi previamente utilizado em estudos envolvendo fármacos antipsicóticos (haloperidol e risperidona), por ser um modelo amplamente utilizado em investigações

in vitro voltadas a elucidação de mecanismos relacionados a resposta imune inata (JUNG et al., 2016).

Inicialmente foi conduzida avaliação do efeito pró e antiproliferativo da ZIP. A partir deste ensaio a dose mais efetiva foi utilizada para avaliar o efeito da ZIP sobre outros marcadores da resposta inflamatória macrofagocitária: modulação do ciclo celular, níveis de $O_2^{\bullet -}$, ON e EROs, modulação dos níveis proteicos e de expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias (IL-1B, IL-6 e TNF α) e da citocina anti-inflamatória IL-10.

No presente estudo, além do controle negativo (macrófagos não tratados) foi utilizado um controle pró-inflamatório a exposição a fitohemaglutinina (PHA). A PHA é uma mucofitohemaglutinina extraída da espécie *Phaseolus vulgaris* que induz resposta imunogênica proliferativa em CMSPs incluindo macrófagos. É considerada uma molécula associada a dano tecidual ou resposta antigênica (DAMP = *damage-associated molecular patterns*) e não uma molécula MAMPs (Microbe-Associated Molecular Patterns), ou seja, uma molécula associada a infecção microbiana (WOO et al., 2015).

Um controle positivo anti-inflamatório também foi utilizado no estudo. Para tanto escolheu-se o lítio (Li) que além de ser um modulador de humor utilizado no tratamento do transtorno bipolar e na politerapia antipsicótica da SCZ (KATZUNG & TREVOR, 2016; GABARDO, 2016) possui propriedades anti-inflamatórias bem estabelecidas via inibição da enzima glicogênio sintase quinase 3 (GSK-3), (BEUREL & JOPE, 2014). Foi utilizada a concentração terapêutica do Li como controle positivo anti-inflamatório (0,7 mEq/L).

As condições de cultura dos macrófagos utilizada no presente estudo foram previamente descritas por Jung et al (2016). Os macrófagos da linhagem RAW 264.7 (ATCC® TIB-71™) foram obtidos a partir do Banco de Células do Rio de Janeiro. A linhagem foi expandida e cultivada em meio DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal, 1% de antibióticos (penicilina/ estreptomicina) e 1% de antifúngico (anfotericina B). A concentração celular utilizada para a realização dos experimentos foi de 1×10^5 células/mL.

Tanto a ZIP quanto a PHA e o Li foram dissolvidos em meio DMEM em concentrações específicas, e todos os procedimentos seguiram os preceitos padrões da farmacotécnica.

Para a realização dos protocolos experimentais os macrófagos foram inicialmente transferidos para placas de 96 poços onde permaneceram durante 24 h a fim de se fixarem nas paredes. Após este período foi adicionado os tratamentos e as células permaneceram em cultura durante 72 h antes de se realizarem as análises bioquímicas, imunológicas e moleculares.

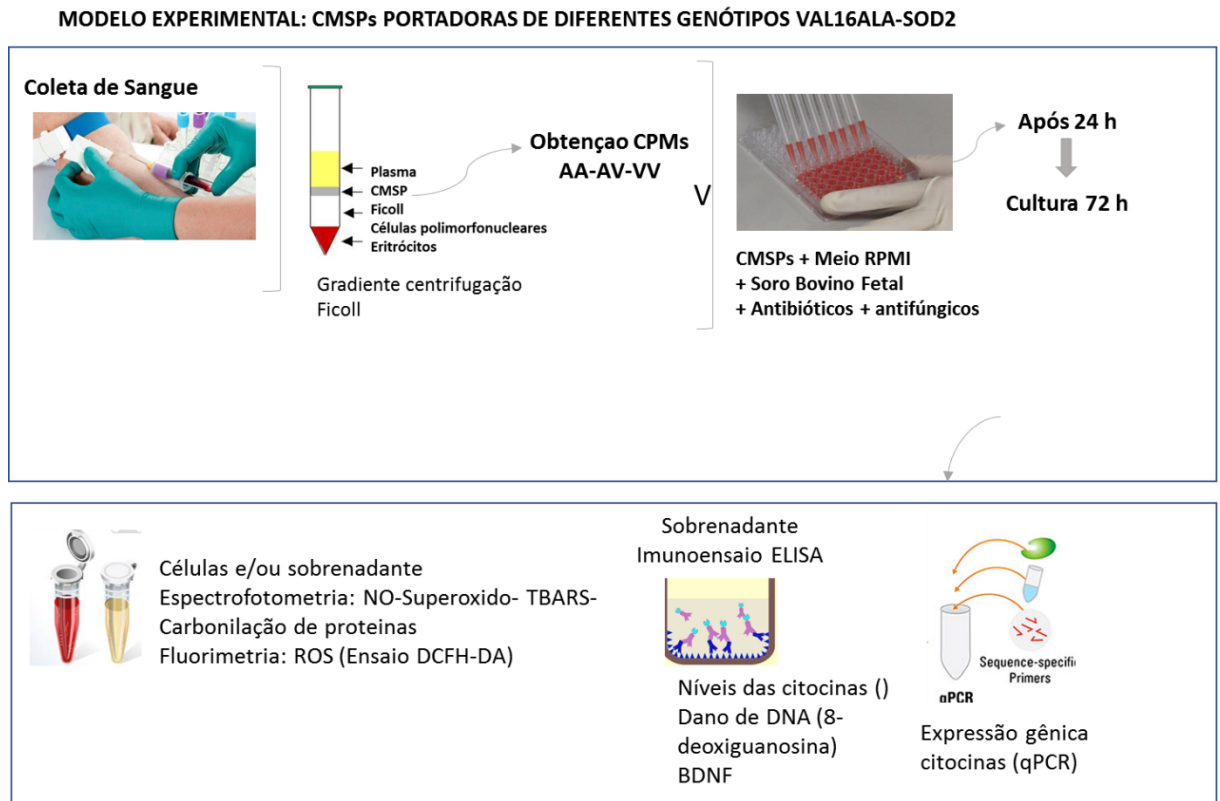
3.1.2 Protocolo *in vitro* 2

Efeito da ZIP na resposta inflamatória de CMSPs portadoras de diferentes genótipos do polimorfismo Val16Ala-SOD2.

A Figura 8 apresenta o esquema geral desse protocolo. Esse segundo estudo foi realizado a fim de averiguar se a modulação inflamatória e oxidativa pela ZIP seria diretamente influenciada pelo desbalanço S-HP de hidrogênio causado pelo polimorfismo Val16Ala-SOD2 e se este medicamento poderia garantir uma ação genotóxica.

Os diferentes genótipos (AA, AV e VV) desse polimorfismo foram identificados conforme descrito no estudo de Barbisan et al (2014). As amostras de sangue foram inicialmente centrifugadas à 2.500 rpms por 20 minutos, utilizando-se um gradiente de centrifugação (Ficoll) a fim de se obter o isolamento das CMSPs. Foram utilizadas amostras sanguíneas de 3-4 indivíduos para cada genótipo do polimorfismo Val16Ala-SOD2. As amostras foram obtidas de pacientes que assinaram termo de consentimento relacionado ao projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFSM reconhecido pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP/MS) sob Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE) (número do processo: 0332.0243.000-11).

Figura 8: Esquema geral do protocolo experimental 2: efeito do polimorfismo Val16Ala-SOD2 na modulação inflamatória de CMSPs expostas à ZIP.



Fonte: O autor

As CMSPs posicionadas na interfase dos tubos foram transferidas para um novo tubo e foi adicionado 5mL de meio de cultura RPMI 1640 enriquecido com 10% de soro bovino fetal (SBF), 1% de penicilina, 1% de estreptomicina. Utilizamos a câmara de Neubauer para realizarmos a contagem do número de CMSPs, para posterior uniformização da concentração das células. Posteriormente, foi conduzida a distribuição das células na concentração de 1×10^5 cel/mLs em placas de 96 poços.

Essa cultura foi incubada durante 24 horas a fim de possibilitar a fixação das células nas paredes dos poços e adaptações das mesmas. Após este período, a cultura foi mantida durante 72 h em estufa com CO_2 a 5% a 37°C . Este procedimento foi repetido três vezes e tanto o sobrenadante quanto as células foram utilizados para as análises dos marcadores oxidativo-inflamatórios. As leituras de absorbância e fluorescência foram realizadas no aparelho SpectraMax i3x Multi-Mode microplate reader (Molecular Devices- USA). Todos os resultados foram apresentados como percentagem (%) em relação ao controle negativo (sem tratamento).

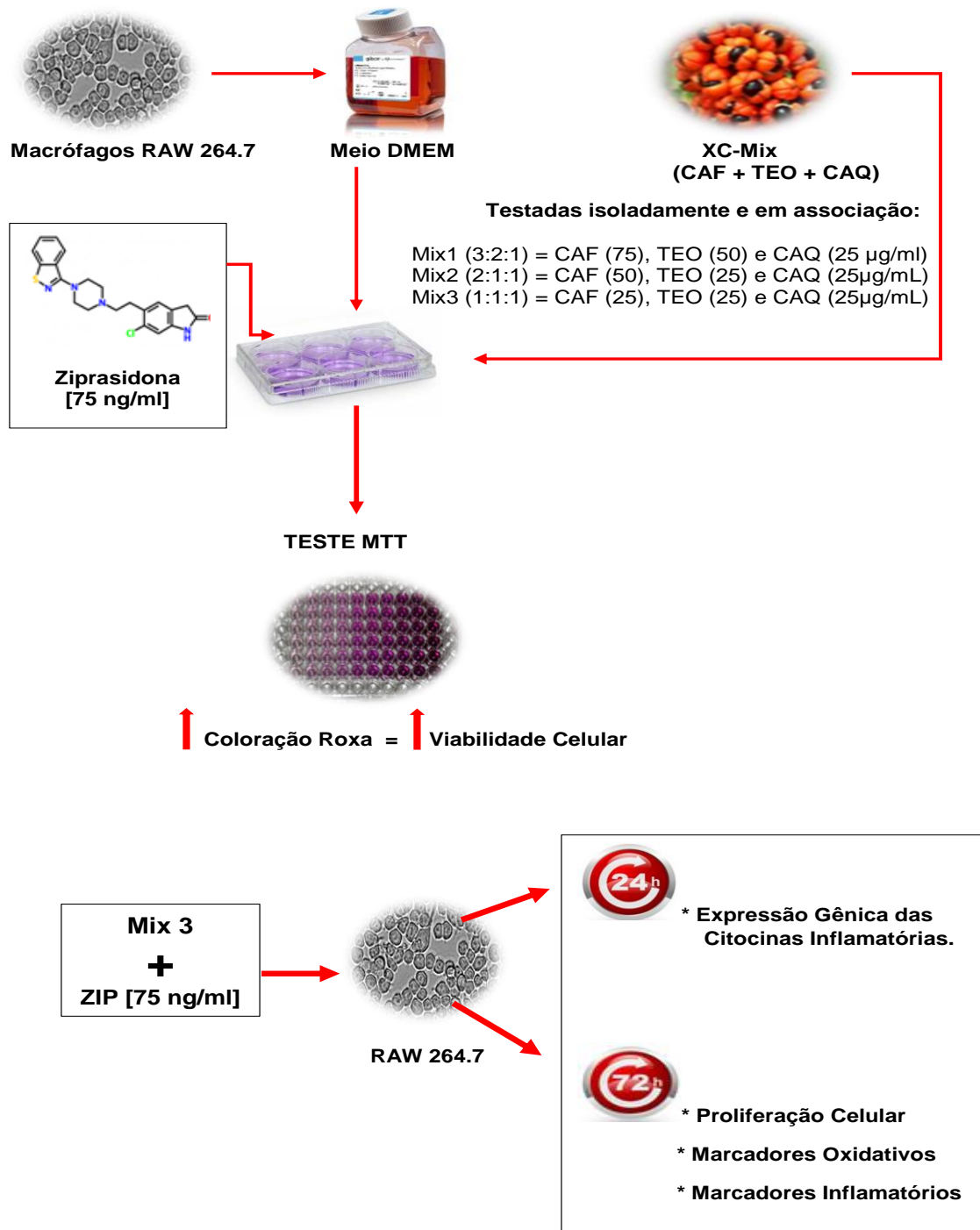
3.1.3 Protocolo *in vitro* 3

Efeito da matriz química do guaraná na modulação da resposta inflamatória e de estresse oxidativo desencadeada pela ZIP em macrófagos RAW 264.7.

Este protocolo também foi realizado usando macrófagos RAW 264.7 (ATCC® TIB-71™) como modelo experimental e cultivadas conforme descrito no estudo de Jung et al (2016). Todos os protocolos foram realizados na temperatura de 37°C em uma incubadora de 5% CO₂ onde as células foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de soro bovino, penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 mg/mL). As células (1×10^5) foram colocadas em placas de 6 poços e aderidas em 24 horas antes de receberem a suplementação com o XC-Mix e ZIP. Todas as análises foram realizadas em cultura celular de 72 horas conforme demonstrado na figura 9.

Inicialmente o efeito isolado da matriz química do guaraná na proliferação celular de macrófagos ativados pela ZIP foi avaliado em cultura celular de 72 h. A curva de concentração de moléculas isoladas testadas aqui foi similar à descrita por Barbisan et al (2017) que também estudou o efeito do XC-Mix em macrófagos ativados expostos ao Li : 0, 0.25, 50, 75, 100 e 200 µg/mL. Destes resultados, nós produzimos e testamos três potenciais XC-Mix. A concentração de referência para XC-Mix foi baseada na quantificação das moléculas bioativas em um extrato hidroalcoólico de guarana conforme publicado por Bittencourt et al (2013) (CAF = 12.240 mg/g; TEO = 6.733 mg/g e CAQs totais = 4.336 mg/mg). Nesta concentração referencial a proporção estimada foi : 3: CAF, 2: TEO and 1: CAQs totais. Portanto, no primeiro XC-Mix (XC-1Mix) (3:2:1) destas moléculas foram adicionadas concentrações de CAF (75 µg/mL), TEO (50 µg/mL e CAQ (25 µg/mL) em meio de cultura dos macrófagos. O segundo XC-Mix (XC-2Mix) (2:1:1) foi produzido com uma mistura contendo CAF (50 µg/mL), TEO (25 µg/mL) e CAQ (25µg/mL). O terceiro XC-Mix (XC-3Mix) (1:1:1) foi produzido com uma mistura contendo concentrações iguais das três moléculas isoladas (25 µg/mL).

Figura 9: Esquema geral do protocolo experimental 3: efeito da matriz química do guaraná na modulação da resposta inflamatória e de estresse oxidativo desencadeada pela ZIP em macrófagos RAW 264.7.



Fonte: O autor

3.2 ENSAIOS EXPERIMENTAIS

Os seguintes ensaios serão utilizados nos protocolos experimentais 1, 2 e 3

3.2.1 Ensaio MTT

Este teste será utilizado para avaliar a taxa de proliferação celular em culturas de 72 horas seguindo metodologia segundo Mosmann et al (2013) modificada por Barbisan et al (2014). O brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) é um ensaio espectrofotométrico em que as células tratadas são incubadas durante 1 hora com o reagente MTT a 37°C. A proliferação é indiretamente avaliada uma vez que o sal de tetrazólio, hidrossolúvel, de coloração amarelada, é facilmente incorporado por células viáveis, que reduzem este composto em suas mitocôndrias pela atividade da enzima mitocondrial succinato desidrogenase. Com a redução o MTT se converte em cristais de formaza que não são solúveis em água e que apresentam coloração roxo-azulada. Nas células, estes sais ficam armazenados no citoplasma celular. Por este motivo, as culturas são solubilizadas via adição de dimetilsulfóxido (DMSO) que libera o formazan permitindo a sua quantificação espectrofotométrica. Logo a seguir a absorbância será medida a 570 nm. Absorbâncias maiores indicam maior taxa proliferativa em relação ao controle negativo.

3.2.2 Quantificação de marcadores do metabolismo oxidativo

Os seguintes marcadores foram quantificados nos tratamentos: ON, O_2^- e EROs com protocolos previamente descritos em Jung et al (2016). A determinação indireta de ON envolve a mensuração espectrofotométrica de seus produtos de decomposição estáveis de nitrato em nitrito. Após a exposição das células aos psicofármacos, foi retirado 100 μ l do sobrenadante da cultura celular e adicionado a uma placa de 96 poços, e, em seguida, 100 μ l de reagente de Griess. A mistura foi incubada durante 20 minutos a 25°C e a absorbância final medida em 540 nm.

O O_2^\bullet - foi quantificado utilizando-se 10 μ l do reagente nitro blue tetrazolium (NBT) adicionado a 100 μ l de suspensão celular. Esta reação foi incubada por 3 horas

a 37°C. Logo após o sobrenadante foi descartado e procedeu-se a adição de 100 µl de DMSO. Após 10 minutos de incubação a absorbância foi lida a 560 nm.

Para a quantificação de EROs foi utilizada técnica previamente descrita por Barbisan et al (2014) com amostras de sobrenadante da cultura celular que foram transferidas para uma placa de 96 poços preta. Logo a seguir foi adicionado Diclorofluoresceína (DCF) (10 mM). A reação foi incubada durante 60 minutos à temperatura ambiente. A seguir a fluorescência foi medida a uma excitação de 488 nm e uma emissão de 525 nm, e os resultados expressos em picomoles / mL de DCF.

3.2.3 Marcadores de dano oxidativo

Apenas no segundo estudo serão também conduzidos ensaios para se avaliar o aumento de dano oxidativo causado pela exposição ao ZIP. A peroxidação lipídica foi estimada via técnica espectrofotométrica do TBARS (substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico) que permitem determinar a presença de peroxidação lipídica, por meio da reação do ácido tiobarbitúrico com o MDA. Assim, quanto maior a presença de MDA maiores os índices de lipoperoxidação. Para realização dos testes em todas as amostras será acrescida água, ácido fosfórico 10%, ácido tricloroacético 20% e ácido tiobarbitúrico 1,2%. Uma curva de dosagem de MDA foi produzida para determinar a equivalência em relação a cada amostra em teste. Após a adição de todos os reagentes, a reação foi incubada durante 1 hora a 95°C. Logo após, a leitura das absorbâncias a 532nm em espectrofotômetro foi conduzida. Os resultados foram expressos como nmol de MDA/mL de células (CATALGOL et al., 2007).

Os níveis de carbonilação de proteínas também foram determinados via quantificação da fragmentação das cadeias e oxidação de quase todos os tipos de aminoácidos que levam a produção de compostos carbonilados (VASCONCELOS et al., 2007). Estes danos foram mensurados pela determinação de formação de grupos carbonil baseados na reação com dinitrofenilidrazina como previamente descrito por Morabito e colaboradores (2004). O conteúdo de formação de carbonil foi determinado através de leitura em leitor de placas em placa de elisa UV no comprimento de onda 370nm.

3.2.4 Análise do ciclo celular via citometria de fluxo

Afim de averiguar o efeito da ZIP na resposta inflamatória dos macrófagos, foi conduzida uma análise do ciclo celular via citometria de fluxo em culturas de 72 horas. Para tanto, as células previamente tratadas foram expostas a Triton 0,05% . Esta exposição levou ao rompimento das membranas celulares permitindo assim, a entrada do Iodeto de Propídeo (PI) para o interior da célula. Este reagente (PI) tem a capacidade de se intercalar com as moléculas de DNA e esta reação produz fluorescência que é quantificada pelo laser do citômetro. Células na fase G0 ou G1 possuem menor emissão de fluorescência em relação a fase S (que possui emissão intermediária) e G2 ou em mitose incompleta. Isto porque nesta ultima fase o material genético já está totalmente duplicado e, portanto, as células produzem maior fluorescência. Após 72 h de exposição a um agente pró-inflamatório que induz mitose espera-se encontrar um maior número de células na fase S ou G2 em relação ao controle negativo. Esta análise foi realizada com base no estudo de Azzolin e colaboradores et al., 2016 com o equipamento ACCURI C6 (BD-Biosciences-USA).

3.2.5 Análise dos níveis de citocinas por imunoenensaio ELISA

Nos dois protocolos foram realizadas quantificações das citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, TNF- α) e anti-inflamatória (IL-10) utilizando-se o teste imunoenzimático ELISA. A quantificação foi feita no meio de cultura após 72 horas de exposição aos tratamentos. Para tanto utilizou-se o *kit Quantikine*[®] que forneceu as recomendações para a realização do ensaio. Brevemente: para cada análise de cada citocina foi adicionado 50 μ L do diluente RD1W a cada poço da placa. A seguir, os padrões dos testes e as amostras foram adicionados nos respectivos poços. Após este procedimento a placa foi selada e incubada durante 1,5 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, o sobrenadante foi removido e os poços foram lavados duas vezes com solução de lavagem, sendo logo a seguir o anticorpo primário adicionado e incubado por 30 minutos a temperatura ambiente. Após a exposição ao anticorpo primário, a placa foi lavada novamente recebendo a adição de 100 μ L de solução substrato da reação, com incubação de 20 minutos a temperatura ambiente. Após o período de incubação, foram adicionados 50 μ L da solução de parada de

reação a cada poço. Finalizado estes procedimentos cada citocina foi quantificada via leitura da densidade óptica utilizando um leitor de microplacas ajustado para 450 nm.

3.2.6 Análise dos níveis dano de dna por imunensaio ELISA

No protocolo 2 também foram conduzidas análise de dano de DNA via quantificação da 8-deoxiguanosina (8-oxodguO / oxDNA). Este marcador foi quantificado por imunensaio ELISA seguindo procedimentos similares aos descritos no item 4.2.3 do presente trabalho.

3.2.7 Análise da expressão gênica via qRT-PCR

A análise da expressão gênica foi realizada 24 horas após a exposição das células aos psicofármacos. O RNA total foi extraído utilizando Trizol, seguindo as instruções do fabricante (Ludwig-Biotec, Brasil). O RNA extraído foi mensurado espectrofotometricamente por um NanoDrop Thermo Scientific™ 1000. Para realizar a transcrição reversa, inicialmente foi adicionado às amostras de RNA (500 ng / μ L) 0,2 μ L de DNase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) e foram incubadas em termociclador a 37°C durante 5 minutos, seguido por aquecimento a 65°C durante 10 minutos. O cDNA foi gerado a partir da adição de 1 μ L de cDNA Iscript e 4 μ L de mistura de Iscript (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA-EUA) de acordo com as seguintes condições de reação em termociclador: 5°C durante 10 minutos, 25°C durante 5 minutos, 85°C durante 5 minutos e, finalmente, 5°C durante 60 minutos. O qRT-PCR foi realizado no rotor-Gene Q 5plex GRH Sistema (Qiagen biotecnologia, Alemanha), utilizando o reagente 2x QuantiFast SYBR® Green PCR Master Mix (Qiagen biotecnologia, Alemanha), 1 μ L de amostra, 1 μ M de cada primer (iniciador), água livre de RNases , perfazendo um total de 20 μ L. A reação ocorreu sob as seguintes condições: 95 ° C durante 3 minutos na sequência 40 ciclos de 95° C durante 10 segundos, 60°C durante 30 segundos, seguido por uma curva de *melting* de 60°C a 90°C em passos de 0,5 °C durante 5 segundos.

O gene da beta-actina foi utilizado como *housekeeping*. Um gene *housekeeping* é aquele que está permanentemente expresso nas células, e, portanto, o seu nível serve de controle interno para se averiguar se a técnica está realmente

funcionando. Assim, se um gene não está expresso, mas o gene da beta-actina está expresso significa que o gene está realmente suprimido e não é um problema da técnica. Após esta normalização (gene estudado em relação ao gene *housekeeping*) a expressão do gene estudado em cada tratamento é comparada em relação a expressão do gene observada nos controles não tratados. O equipamento então fornece a relação da expressão entre o controle considerando o controle como tendo a expressão "1". Valores abaixo de 1 significam que a expressão do gene foi diminuída (*down-regulated*) em relação ao controle negativo e valores acima de 1 significam que a expressão do gene foi intensificada (*up-regulated*) em relação ao controle negativo.

Para conduzir a quantificação da expressão dos genes das citocinas e também do gene *housekeeping* utilizado neste estudo, os seguintes primers foram utilizados: Beta-actina (Sense: 5'-TGTGGATCAGCAAGCAGGAGTA-3'; Antisense: 5'-TGCGCAAGTTAGGTTTTGTCA-3'); IL-1B (Sense: 5'-GCGGCATCCAGCTACGAAT-3'; Antisense: 5'-ACCAGCATCTTCCTCAGCTTGT-3'); IL-6 (Sense: 5'-TACCCCAAGGAGAAGATTCCA-3'; Antisense: 5'-CCGTCGAGGATGTACCGAATT-3'); TNF α (Sense: 5'-CAACGGCATGGATCTCAAAGAC-3'; Antisense: 5'-TATGGGCTCATACCAGGGTTTG-3') e IL-10 (Sense: 5'-GTGATGCCCAAGCTGAGA-3', Antisense: 5'-TGCTCTTGTTCACAGGGAAGA-3').

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Por se tratar de estudos *in vitro* todos os ensaios foram realizados em triplicata. Os dados obtidos foram digitados e estatisticamente analisados utilizando-se o programa *GraphPad Prism 5*. No primeiro protocolo, a comparação entre os tratamentos foi feita por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida de teste *post hoc* de Tukey. No segundo protocolo foi conduzida uma análise de variância (ANOVA) de duas vias (já que o efeito do tratamento mais do genótipo Val16Ala-SOD2 estava sendo avaliado), seguido de teste *post hoc* de Bonferroni. Os resultados destas análises foram expressos como média \pm desvio padrão do percentual em relação ao controle negativo. No terceiro protocolo a comparação entre os tratamentos foi realizada por ANOVA seguido de teste *post hoc* de Tukey. Os resultados com $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4 RESULTADOS

Os resultados estão descritos sob a forma de dois artigos científicos e um manuscrito:

- Artigo 1 publicado na Revista *Cytokine*, fator de impacto 3.514.
- Manuscrito que será submetido para a Revista *Mutation Research – Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, fator de impacto 1.996.
- Artigo 2 publicado na Revista *Inflammation*, fator de impacto 2.884.

4.1 ARTIGO 1

Ziprasidone, a second-generation antipsychotic drug trigger *in vitro* macrophages inflammatory response

Thiago Duarte^{1#}, Fernanda Barbisan^{1#}, Pedro Antônio Schmidt do Prado-Lima², Verônica Farina Azzolin¹, Ivo Emílio da Cruz Jung¹, Marta Maria Medeiros Frescura Duarte³, Ivana Beatrice Mânica da Cruz^{10*}

¹ Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria-RS, Brazil.

² Instituto do Cérebro, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, Brazil

³ Universidade Luterana do Brasil, Santa Maria, Santa Maria-RS, Brazil

This author contributed equally with the first author in this manuscript

* Corresponding author. Av Roraima 1000, Prédio 19, Santa Maria -RS, Brazil. ZipCode 97105900. Phone: 55-55-32208163, email: ibmcruz@hotmail.com

Abstract

Antipsychotic drugs are used in the treatment of schizophrenia and other psychiatric disorders. However, almost drugs present side effects causing obesity and other important metabolic alterations associated with chronic inflammatory grade. At contrary, ziprasidone (ZIP) shows attenuate metabolic side effects than others antipsychotic drugs, but there are reports suggesting that this drug could cause allergic, hypersensitive reactions in some patients. As until moment, the nature of ZIP expose on peripheral inflammatory metabolism was not totally clarified, we conduced an *in vitro* study to evaluate the ZIP effect on a commercial macrophage cell cultures (RAW 264.1). Results showed that in non-activated macrophage cells ZIP exposed presented macrophage spreading, increasing cellular proliferation evaluated by MTT assay and flow cytometry analysis, higher levels of oxidant molecules involved with inflammatory response (nitric oxide, superoxide, reactive oxygen species) and proinflammatory cytokines (IL-1, IL-6, TNF α , INF γ). Lower levels of IL-10, an anti-inflammatory cytokine was lower I cells ZIP exposed. These results were more attenuated in comparison of positive inflammatory control (phytohemagglutin) and more intense that lithium (LI) used as anti-inflammatory molecule. ZIP also modulated cytokines gene expression. Therefore, the whole of data suggest that ZIP could present some peripheral inflammatory response, and this response could to explain some allergen-inflammatory response observed in some patients treated with this antipsychotic drug.

Key-words: Ziprasidone, antipsychotic drugs, inflammation, allergens, mononuclear cells

1 Introduction

Several neuropsychiatric diseases can present psychotic symptoms and others, which can be controlled by antipsychotic drugs including schizophrenia bipolar disorder, major depressive disorder (MDD), Tourette's syndrome, generalized anxiety disorder (GAD), obsessive compulsive disorder, autism and and some personality disorders symptoms [1]. Despite, broad use of these drugs, specially second-generation antipsychotics (SGAs), chronic use leads to severe, such as increased risk for metabolic syndrome and diabetes 2 [2], and potential to prolongation of heart Q wave and end to T wave interval [3]. However, metabolic side effect of antipsychotic drugs is not uniform, as described in the meta-analysis performed by Tek et al [4] from data produced by clinical assays. The results showed that olanzapine and clozapine caused highest weight gain compared to placebo. On the other hand, ziprasidone (ZIP) did not present strong effect on body metabolism [5,6].

ZIP is an atypical antipsychotic used to treat schizophrenia also used to treat mania associated with bipolar disorder. This drug belongs to chemical bezisoxazole derivatives chemical class and is a selective monoaminergic antagonist with high affinity for the serotonin Type 2 (5-HT₂), dopamine Type 2 (D₂), 1 and 2 adrenergic and H₁ histaminergic receptors. Moreover, ZIP also is able to inhibit synaptic reuptake of serotonin and noraepinephrine. The antipsychotic effect of ZIP is associated with the combination of its antagonistic functions at D₂ receptors in the mesolimbic pathways and at 5-HT_{2A} receptors located in the frontal cortex [7]. ZIP did not produce active metabolite molecules, but is extensively metabolized in the liver by CYP 3A4 enzyme. ZIP half-life is approximately 5-10 h and reach stable plasmatic concentrations 2-3 days after to start its intake. ZIP pharmacogenetic present low variations related with sex and age of patients [7].

Despite the apparent low ZIP side effects involving metabolic alterations, this drug could present other important side effects associated with inflammatory response. For example, some reports had suggested that ZIP could be trigger allergic responses in psychiatric patients. There are clinical reports involving ZIP use with chest pain and diffuse urticaria [8] and hypersensitive reactions [9-12]. Moreover, prior studies showed genotoxic ZIP effect in human peripheral blood lymphocytes [13-14] and higher lipid peroxidation in human plasma of patients treated with this antipsychotic drug [15].

As until moment, the nature of ZIP expose on peripheral inflammatory metabolism was not totally clarified, we conducted an *in vitro* study to evaluate the ZIP effect on a commercial macrophage cell cultures (RAW 264.1). These cells are highly sensitive to antigen-like substances and previous study using this experimental model showed inflammatory response in cultures exposed to haloperidol and risperidone [16].

2 Material and Methods

2.1 General experimental design and cell culture conditions

An *in vitro* experimental model using murine RAW 264.7 macrophages (ATCC TIB-71) was used to test ZIP effect on inflammatory response under cell culture controlled conditions. Macrophages were cultured as previously described in Jung et al [16]. Briefly, all protocols were performed at 37°C and 5% CO₂ incubator with cells cultured with DMEM medium supplemented with 10 % fetal bovine serum (FBS), penicillin (100 U/mL), and streptomycin (100 mg/mL). Cells (1×10^5) were seeded in 6-well plates and allowed to adhere for 24 h before receive ZIP supplementation.

Therapeutic concentration of ZIP recognised as effective in the treatment of some diseases were adapted to cell culture conditions, and ZIP curve concentration tested here also included two equal low and high concentrations were also evaluated (18.5, 37.5, 75, 150 and 300 ng/L). An inflammatory positive control of inflammatory response induction was used in all experiments (phytohemagglutinin PHA) [17]. As lithium (LI) presents recognized anti-inflammatory properties, this drug was used as anti-inflammatory control using its estimated therapeutic concentration 0.7 mEq [18].

The follow parameters were used to evaluate the potential ZIP inflammatory modulation in 72 h cell culture RAW macrophages: spreading process, cellular proliferation; quantification of the oxidative markers nitric oxide (NO); superoxide anion (SA), reactive oxygen species (ROS) and IL-1 β , IL-6, TNF α and IL-10 cytokines levels. The pharmacogenomics effect of ZIP on cytokines gene modulation was also determined.

2.2 Laboratorial analysis

Macrophages when are exposed to antigen substance present morphological changes that require active actin cytoskeleton remodelling and metabolic adaptation. RAW cells undergo antigen-induced change cell shape presenting spreading and formation of cell protusions [19]. For this reason, the effect of ZIP exposure was initially evaluated by spreading analysis by optical microscopy in 72 h cell cultures.

Spectrophotometrical and fluorimetrical assays were performed with SpectraMax i3x Multi-Mode microplate reader (Molecular Devices- USA). Two protocols were used to evaluate cell proliferation: MTT (3- [4,5dimethylthiazol-2-yl] - 2,5-diphenyltetrazolic bromide) reduction spectrophotometric assay and flow cytometry using iodide propidium dye [20]. The quantification of NO and SA was

performed as described in Morabito et al [21]. ROS was quantified using the 2'-7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA) fluorimetric assay [13].

The cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF α and IL-10) in the cell culture supernatants was measured, according to the manufacturer's instructions; following previously described methodological details in Jung *et al*, 2016. The gene expression of these cytokines was determined by quantitative real time PCR (qRT-PCR) analysis by Rotor-Gene Q 5plex HRM System (QIAGEN Biotechnology, Germany). Total RNA of each treatment was extracted using Trizol, (Invitrogen Life Technologies, USA). To perform reverse transcription, RNA was added to the samples of RNA (1000 ng/ μ L) with 0.2 μ L of DNAase (Invitrogen Life Technologies, USA) at 37°C for 5 minutes, followed by heating at 65°C for 10 minutes. The cDNA was generated with 1 μ L of Iscript cDNA and 4 μ L of Mix Iscript (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA-USA) according to the following reaction conditions: 5°C for 10 minutes, 25°C for 5 minutes, 85°C for 5 minutes and finally 5°C for 60 minutes.

The qRT-PCR analysis was conducted with following reaction conditions: 95°C for 3 min followed by 40 cycles of 95°C for 10 s, 60°C for 30 s followed by a melt curve of 60°C to 90°C in 0.5°C increments for 5 s. All q RT-PCR reactions were made in triplicate, and used 1 μ M of each primer, 1000 ng/ μ L of cDNA, RNAase-free water and 2x QuantiFast SYBR[®] Green PCR Master Mix (QIAGEN Biotechnology, Germany), in a final volume of 20 μ L. A housekeeping gene (beta-actin) was used to normalized gene expression data. The relative expression was calculated using the comparative Cytosine-Timine (CT) and was expressed as the fold expression compared to the control.

The follow specific primer pairs of cytokines were used in this study: IL-1 β

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.

2.3 Statistical analysis

All assays were performed in triplicate independent experiments with, at least five repetitions. The statistical analyses were conducted employing GraphPad Prism 5 software. The results of treatments were compared using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Tukey or Dunnet *post hoc* tests. The results of these analyses were expressed as mean \pm standard deviation.

3 Results

Spreading macrophages were found in cultures treated with ZIP like cultures exposed to positive control (PHA) (Figure 1A). A higher cellular proliferation was found in cells exposed to different ZIP concentrations (Figure 1 B). As ZIP concentrations presented same capacity to induce macrophages proliferation, complementary assays were performed using just estimated ZIP therapeutic concentration. Despite LI to be use as anti-inflammatory control, this molecule cause some induction in the macrophage proliferation. However, this effect was lower than PHA treatment. Cells ZIP exposed showed similar proliferative levels than PHA, and this result was the same in cells ZIP + LI concomitantly exposed (Figure 1C).

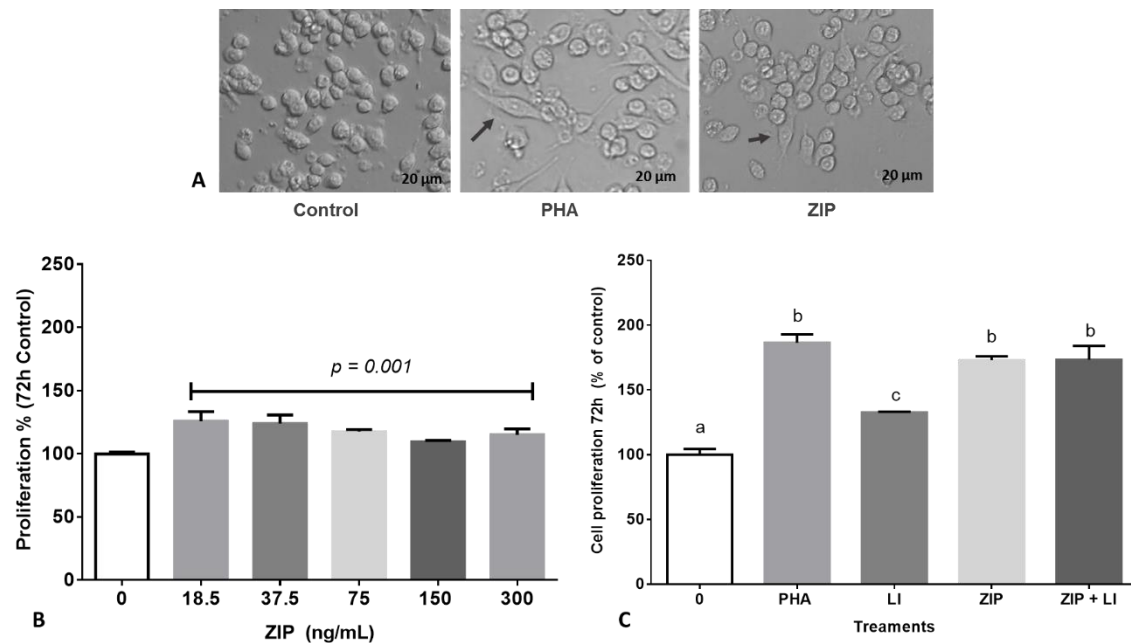


Figure 1: Ziprasidone (ZIP) effects on RAW 264.7 macrophage cells. (A) macrophage spreading, which indicate inflammatory response observed by optical microscopy (x 400 magnification) in the presence of phytohemagglutinin (PHA), a pro-inflammatory positive control and ziprasidone (ZIP) at 75 ng/mL, a plasmatic therapeutic concentration; (B) ZIP effect at different concentrations on 72 h cell culture macrophages determined by MTT assay; (C) Comparison of cell proliferation effect of ZIP at therapeutic concentration with PHA and lithium (Li), an anti-inflammatory molecule. Cells co-cultured with ZIP and Li did not decrease cell proliferation rate in relation to untreated control cells (0). Different letters indicate significant differences determined by One-way analysis of variance followed by post hoc Tukey test, at $p \leq 0.05$.

Cell cycle analysis by flow cytometry in 72 h cell cultures confirmed macrophages proliferative activation by PHA exposure and that Li did not change the frequency of S phase when compared with no-treated control group. Cells ZIP exposed presented a significant increase of cells in S phase than control group, but the increase in the proliferation was not so strong than observed in cells PHA exposed. Concomitant treatment with ZIP + Li leads to decrease significantly the frequency of cells in S phase in comparison with no-treated control group (Figure 2).

As inflammatory activation involves increase in some oxidative molecules we evaluated the effect of ZIP treatment on NO, superoxide and ROS levels of RAW macrophages (Figure 3). As expected, in the presence of PHA NO, superoxide ROS levels increased significantly when compared with no-treated control group. Li

maintained similar levels of these three oxidative markers than control cells, whereas cells ZIP exposed presented higher levels of these biomarkers. In the presence of ZIP + LI cells presented NO and ROS levels than control group cells. However, this treatment showed higher superoxide levels than control group, despite these levels to be lower than PHA positive control group.

Quantification of pro-inflammatory cytokines (IL-1, IL-10, TNF α , INF γ) and the anti-inflammatory IL-10 cytokines was performed in all treatments, as well as gene modulation of these immune markers was also determined. Results presented in Figure 4 showed higher levels of proinflammatory cytokines in cells PHA exposed when compared with no-treated control group. At contrary, IL-10 levels were lower in PHA treatment in comparison with control group.

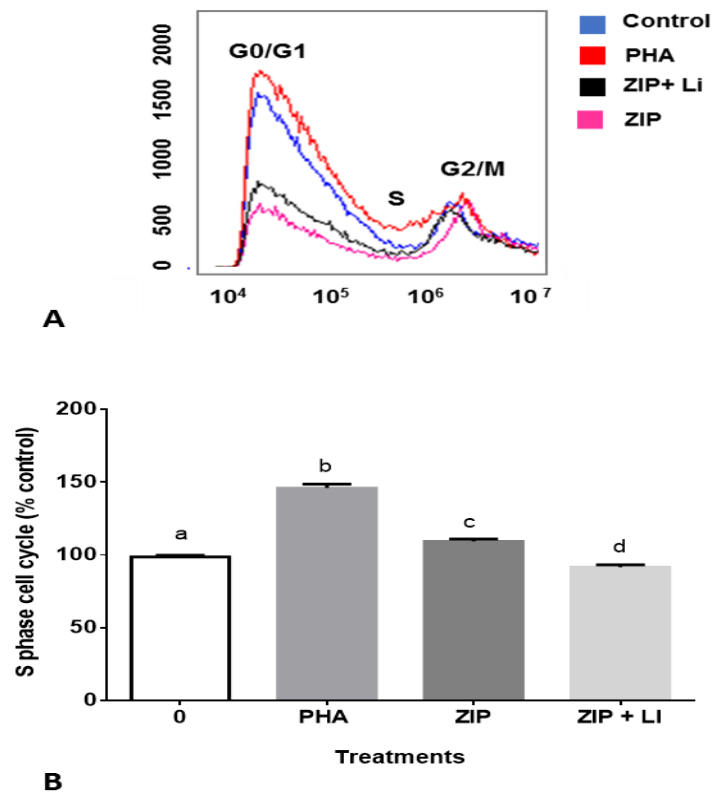


Figure 2: Ziprasidone (ZIP) effects on cell cycle RAW 264.7 macrophage cells determined by flow cytometry. (A) representative flow cytometry graphic of macrophage cells untreated (0), exposed to phytohemagglutinin (PHA), a pro-inflammatory positive control, to ziprasidone (ZIP) at 75 ng/mL, a plasmatic therapeutic concentration and to ZIP plus lithium, an anti-inflammatory drug; (B) Frequency of cells in S phase determined by flow cytometry, which indicate inflammatory induction by PHA and ZIP treatments. Different letters indicate significant differences determined by One-way analysis of variance followed by post hoc Tukey test, at $p \leq 0.05$.

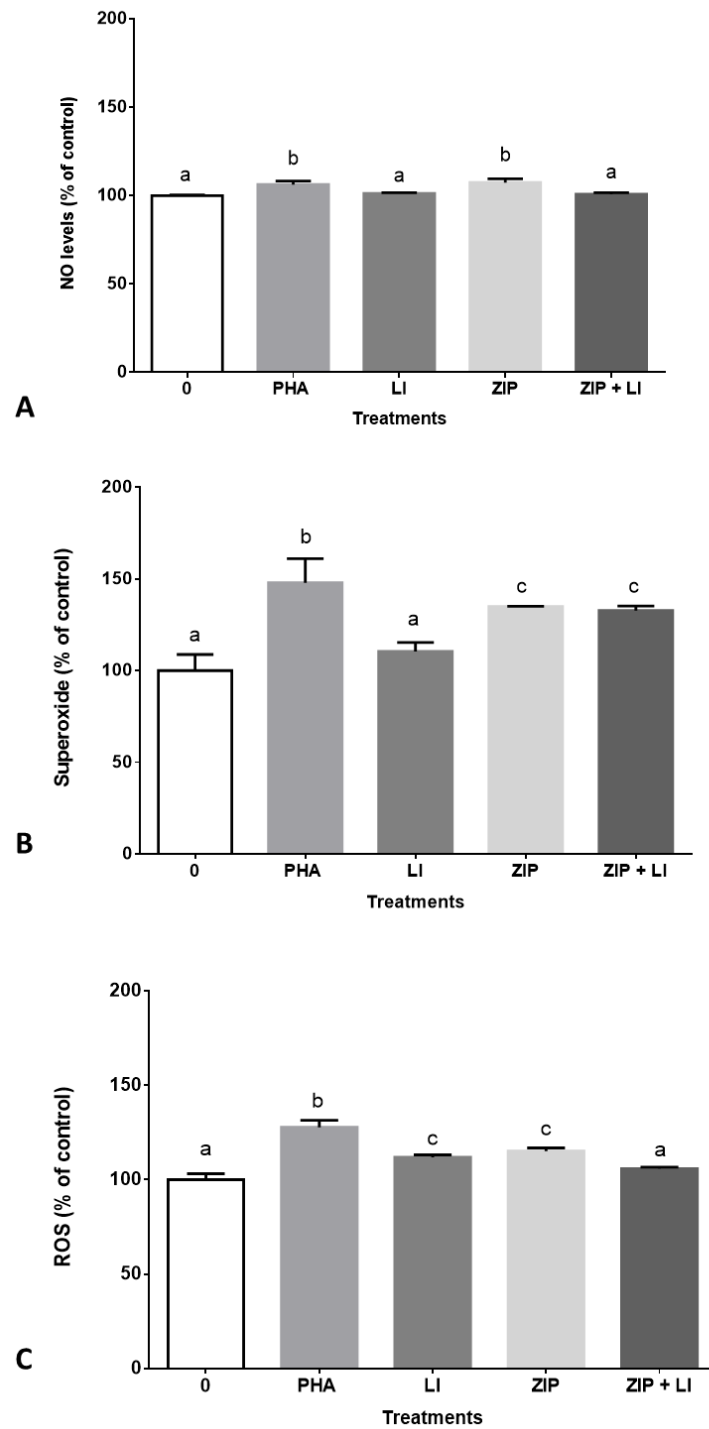


Figure 3: Ziprasidone (ZIP) effects on oxidative markers of RAW 264.7 macrophage cells. (A) nitric oxide (NO) levels; (B) superoxide anion levels; (C) reactive oxygen species (ROS) levels. Treatments: untreated control group (0), phytohemagglutinin (PHA), a pro-inflammatory positive control, ziprasidone (ZIP) at 75 ng/mL, a plasmatic therapeutic concentration; lithium (Li), an anti-inflammatory drug and ZIP plus Li. Different letters indicate significant differences determined by One-way analysis of variance followed by post hoc Tukey test, at $p \leq 0.05$.

Cells exposed to LI, which is considered an anti-inflammatory molecule showed higher levels of IL-1 in comparison with control group. But the increase of this molecule was just 10% higher than no-treated cells. In relation to other proinflammatory cytokines and IL-10, cells LI treated presented similar levels than control group.

Cells treated with just ZIP drug showed higher proinflammatory cytokines levels than control group. However, these levels were lower than PHA treatment. A slight, but significant decreasing in the IL-1, IL-6 and INF γ levels was observed in cells treated concomitantly with ZIP + LI in relation to control group. However, this treatment presented similar TNF α values than observed in cells just ZIP treated. Both, ZIP and ZIP + LI presented higher IL-10 levels than cells PHA treated. However, this effect was more pronounced in ZIP than ZIP + LI treatment. Despite ZIP and ZIP + LI increase IL-10 levels, this effect was partial and did not revert to IL-10 levels observed in control group cells.

Cytokines gene were modulated by all treatments (Figure 4 B). PHA treatment upregulated all proinflammatory cytokines genes and down-regulated IL-10 gene. In the presence of LI, cells downregulated IL-1 and TNF α genes and up-regulated IL-10 genes confirming the anti-inflammatory action of this molecule. When cells were ZIP exposed all cytokines, genes were upregulated in comparison with untreated control group. However, different of PHA treatment, ZIP was also able to upregulated the anti-inflammatory IL-10 gene. The concomitant treatment with ZIP + LI did not change IL-1 gene expression pattern, but caused upregulation of IL-6, TNF α and INF γ gene. However, this upregulation was not so intense (< 2 times of control group). This treatment did not affect the expression of IL-10 gene when compared with untreated control group.

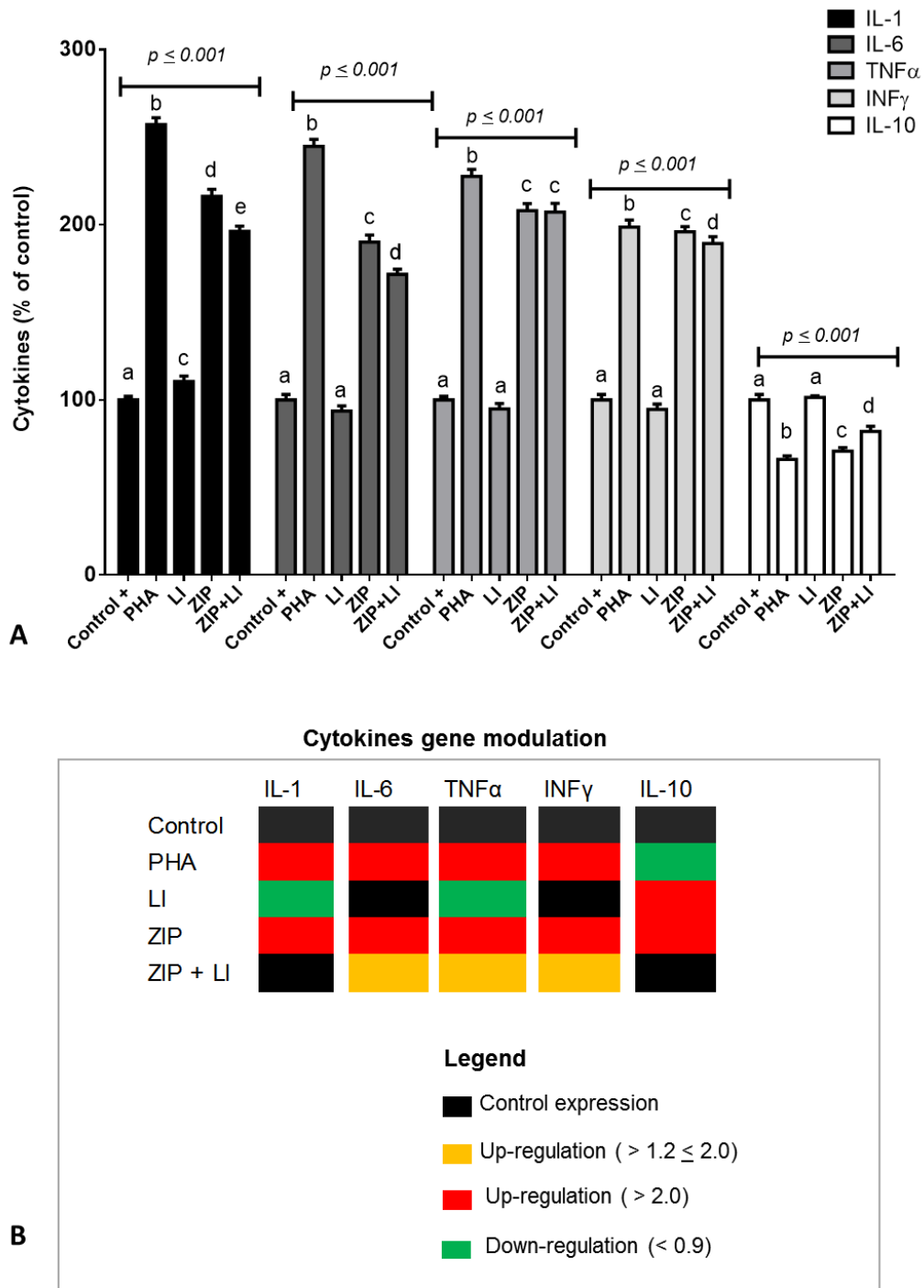


Figure 4: Ziprasidone (ZIP) effects on cytokines of RAW 264.7 macrophage cells. (A) levels of IL-1, IL-6, TNF α and IL-6 determined by ELISA immunoassays. (B) effects on cytokines gene expression determined by qRT-PCR analysis. Data were normalized by Beta-actin housekeeping gene. Treatments: untreated control group (0), phytohemagglutinin (PHA), a pro-inflammatory positive control, ziprasidone (ZIP) at 75 ng/mL, a plasmatic therapeutic concentration; lithium (Li), an anti-inflammatory drug and ZIP plus Li. Different letters indicate significant differences determined by One-way analysis of variance followed by post hoc Tukey test, at $p \leq 0.05$.

3 Discussion

In the present investigation, we evaluated the potential effect of ZIP, an antipsychotic drug on inflammatory response using RAW macrophages cells, as an *in vitro* experimental model. Results showed that in non-activated macrophage cells ZIP cause some inflammatory response. This suggestion is based in the observation that ZIP caused macrophage spreading, increasing cellular proliferation, which was evaluated for two protocols (MTT assay and cell cycle by flow cytometry analysis). Cells ZIP exposed also presented higher levels of oxidant molecules related with inflammatory response (NO, ROS and superoxide) and proinflammatory cytokines (IL-1, IL-6, TNF α , INF γ) and lower levels of IL-10, an anti-inflammatory cytokine. However, macrophages ZIP exposed did not present high inflammatory response than observed in cells exposed to PHA, a lectin antigen found in some plants. Due its antigenic properties PHA induces mitosis and inflammatory cascade in mononuclear cells (T-cells and macrophages) [17]. For our best knowledgment this is the first study that analysed the potential effect of ZIP on macrophage inflammatory response. In fact, ZIP induced macrophage spreading, mitosis, modulation of some oxidative molecules, which are closely related with inflammatory response, especially superoxide anion [20]. Moreover, a clear increase in proinflammatory cytokines was observed in cells ZIP treated.

Here, it is important point out that we use LI as anti-inflammatory molecule since this drug is able to inhibit the synthesis of prostaglandins, and the activity of glycogen synthase kinase-3 β enzyme, which facilitates the transcription factor nuclear factor (NF)- κ B, a key inflammatory regulator molecule [18]. As polypharmacy is a common in the treatment of psychiatric patients, especially in bipolar disorder at high risk of familial load for suicidal behaviour [19] we solved to test the potential interaction

between ZIP and LI macrophage inflammatory response. In general, ZIP + LI concomitant exposure softened the inflammatory effects observed in cells just treated with ZIP drug. In the clinical practice pharmacotherapy for nomixed mania use LI as the first-line recommendation, and a second-generation antipsychotic can be added. Quetiapine is the first-choice, and when is not possible to treat patients with this drug, the next choice is risperidone, followed by olanzapine. However, if the patient is still refractory others antipsychotic drugs can be considered including ZIP [22]. Despite association between LI and ZIP to not be the first choice in clinical treatment, our data suggest that concomitant of these psychopharmacs could ameliorates peripheral inflammatory response associated with isolated use of ZIP. However, complementary clinical assays need to be performed to confirm the results described here.

Potential inflammatory effect of ZIP drug described here is in concordance of prior investigation which investigated the effect of antipsychotic drugs on C-reactive protein (CRP), cellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) and E-selectin, which are considered a systemic blood inflammatory marker. The results were obtained from patient's participants of the CATIE Schizophrenia Trial phase 1. After three months, patients ZIP treated presented higher levels of ICAM-1 and VCAM-1 in comparison with baseline levels. In the follow-up analysis (18 months) higher CRP levels were also observed in patients ZIP treated, despite these values to be lower than patients treated with other antipsychotic drugs, such as risperidone, quetiapine and olanzapine [9].

Unfortunately, there are few previous investigations exploring the role of ZIP on inflammatory metabolism. However, some clinical reports could be use to support the occurrence of this process. For example, Hamera and Khishfe recently reported the occurrence of Kounis syndrome (KS), which is an allergic reaction preceding and

leading to an acute coronary syndrome. In the case report, a 38-year old man diagnosed with bipolar disorder ingresses in emergency department for suicidal ideations and was pharmacologically treated with LI. However, this treatment was not well succeeded, and the patient become acutely psychotic and violent been treated with ZIP. After forty minutes, he presented chest pain and diffuse urticaria [8]. Hypersensitivity reaction associated with ZIP have also described by other authors [9,10,11,12].

In fact, macrophages can be considered a central cell to both innate and adaptive immunity, and essential to the expression of allergic inflammation [23]. In general, this cell is the first one to sense trouble and respond to disturbances in almost body. Despite, there is differences in the macrophages from different tissues, these cells present many receptors in common that help macrophages sense what is going on [25]. Antigen exposure can trigger macrophage polarization into classically activated macrophages (M1 cells, which present higher proinflammatory cytokines IL-1, IL-6, TNF α and INF γ) and alternatively activated macrophages (M2 cells, which present higher anti-inflammatory levels, such as IL-10 cytokine) [26].

Pharmacogenomic effect of ZIP on cytokines genes was also observed in the results described here. However, despite ZIP cause up-regulation of proinflammatory cytokines, this antipsychotic drug also up-regulated IL-10 gene, an anti-inflammatory cytokine. This results is important, since suggest the occurrence of macrophages polarization from M1 to M2, mainly when we compare results with PHA antigen, which showed down-regulation of IL-10. ZIP effect on cytokine gene modulation was previously described by an *in vitro* study conducted by Sarvári et al [27]. In this study, the authors observed that ZIP up-regulated proinflammatory cytokines gene expression of primary human adipose-derived stem cells.

In summary, despite methodological constraints associated with *in vitro* studies, our data suggest that ZIP could present some peripheral inflammatory response. We speculate that inflammatory response triggered by ZIP could be associated with allergic side effects described in the literature, from clinical case reports.

Acknowledgments

The grants and fellowships associated with this study was funded by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento do Ensino Superior (CAPES). The authors thank all Lab Biogenomic researchers, which gave some technical support to perform *in vitro* assays.

References

- [1] R. Musilt, M. Obermeier, P. Russ & M. Hamerle. Weight gain and antipsychotics: a drug safety review. *Expert Opin. Drug Saf.* 14 (2014) 73-96.
- [2] R.M. Paredes, M. Quinones, K. Marballi, X. Gao, C. Valdez, S.S. Ahuja, D. Velligan and C. Walss-Bass. Metabolomic profiling of schizophrenia patients at risk for metabolic syndrome. *Int J Neuropsychopharmacol.* 17 (2014) 1139–1148.
- [3] H. Takeuchi, T. Suzuki, G. Remington, H. Uchida. Antipsychotic Polypharmacy and Corrected QT Interval: A Systematic Review. *Can J Psychiatry.* 60 (2015) 215–222.
- [4] C. Tek, S. Kucukgoncu, S. Guloksuz, S.W. Woods, V.H. Srihari, A. Annamalai. Antipsychotic-induced weight gain in first-episode psychosis patients: a meta-analysis of differential effects of antipsychotic medications. *Early Interv Psychiatry.* 10 (2016) 193-202.
- [5] D. Arterburn, G.C. Wood, M.K. Theis, E.O. Westbrook, J. Anau, M. Rukstalis, J.A. Boscarino, Z. Daar, G.S. Gerhard. Antipsychotic medications and extreme weight gain in two health systems. *Obes Res Clin Pract.* 10 (2016) 408-423.
- [6] D.M. Rubin, A.R. Kreider, M. Matone, Y.S. Huang, C. Feudtner, M.E. Ross, A.R. Localio. Risk for incident diabetes mellitus following initiation of second-generation antipsychotics among Medicaid-enrolled youths. *JAMA Pediatr.* 169 (2015) e150285.

- [7] S.M. Stahl, D.K. Shayegan. The psychopharmacology of ziprasidone: receptor-binding properties and real-world psychiatric practice. *J Clin Psychiatry*. 64 (2003) 6-12.
- [8] L. Hamera, B.F. Khishfe. Kounis syndrome and ziprasidone. *Am J Emerg Med*. 35 (2017) 493-494 doi: 10.1016/j.ajem.2016.11.061. [Epub ahead of print]
- [9] J.F. Lister, B. Voinov, L. Timothy, J.R. Bean. Drug-Induced Systemic Hypersensitivity Reaction Associated With Ziprasidone: An Atypical Occurrence. *J Clin Psychopharmacol*. 35 (2015) 478-480.
- [10] M.S. Kim, S.W. Kim, T.Y. Han, S.J. Son, J.H. Lee, E.J. Kim. Ziprasidone-induced hypersensitivity syndrome confirmed by reintroduction. *Int J Dermatol*. 53 (2014) e:267-8.
- [11] C. Akkaya, A. Sarandol, K. Aydogan, S. Kirli. Urticaria and angio-oedema due to ziprasidone. *J. Psychopharmacol*. 21 (2007) 550-552.
- [12] H.L. Ku, T.P. Su, Y.H. Chou. Ziprasidone-associated pedal edema in the treatment of schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 30 (2006) 963-964.
- [13] I. Karapidaki, M.T. Ekonomopoulou, K. Akritopoulou, D. Anastakis, Z. Iakovidou-Kritsi. Cytogenetic effects of valproic acid and ziprasidone in human lymphocyte cultures. *Neuropsychobiology*. 64 (2011) 219-223.
- [14] H. Kefelioğlu, Z. Atlı Şekeroğlu, G. Coşguner, S. Konaş Yedier, V. Şekeroğlu. Ziprasidone induces cytotoxicity and genotoxicity in human peripheral lymphocytes. *Drug Chem Toxicol*. 40 (2017) 425-437. [Epub ahead of print]
- [15] A. Dietrich-Muszalkska, J. Kopka, A. Kwiatkowska. The effects of ziprasidone, clozapine and haloperidol on lipid peroxidation in human plasma (*in vitro*): comparison. *Neurochem Res*. 38 (2013) 1490-1495.
- [16] I.E. da Cruz Jung, A.K. Machado, I.B. da Cruz, F. Barbisan, V. F. Azzolin, T. Duarte, M.M. Duarte, P.A. do Prado-Lima, G.V. Bochi, G. Scola, R.N. Moresco. 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 (2016) 1715-1723.
- [17] D. Kim, Y. Yamasaki, Z. Jiang, Y. Nakayama, T. Yamanishi, K. Yamaguchi, T. Oda. Comparative study on modeccin- and phytohemagglutinin (PHA)-induced secretion of cytokines and nitric oxide (NO) in RAW264.7 cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 43 (2011) 52-60.
- [18] A. Nassar, A.N. Azab. Effects of lithium on inflammation. *ACS Chem Neurosci*. 5 (2014) 451-458.
- [19] D.M. Mosser, J.P. Edwards (2008) Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 8 (2008) 958-969.

- [20] V.F. Azzolin, F.C. Cadoná, A.K. Machado, M.D. Berto, F. Barbisan, E.B. Dornelles, W.G. Glanzner, P.B. Gonçalves, C.G. Bica, I.B. da Cruz. Superoxide-hydrogen peroxide imbalance interferes with colorectal cancer cells viability, proliferation and oxaliplatin response. *Toxicol In Vitro*. 32 (2016) 8-15.
- [21] G. Morabito, D. Trombetta, K. Singh Brajendra, K. Prasad Ashok, S. Parmar Virinder, C. Naccari, F. Mancari, A. Saija, M. Cristani, O. Firuzi, L. Saso. Antioxidant properties of 4-methylcoumarins in *in vitro* cell-free systems. *Biochimie*. 92 (2010) 1101-1107.
- [22] M. Fornaro, D. De Berardis, A.S. Koshy, G. Perna, A. Valchera, D. Vancampfort, B. Stubbs. Prevalence and clinical features associated with bipolar disorder polypharmacy: a systematic review. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 12 (2016) 719-735.
- [23] O. Mohammad, D.N. Osser. The psychopharmacology algorithm project at the Harvard South Shore Program: an algorithm for acute mania. *Harv Rev Psychiatry*. 22 (2014) 274-294.
- [24] H.Y. Tung, C. Landers, E. Li, P. Porter, F. Kheradmand, D.B. Corry *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 16 (2016) 51-58.
- [25] K. Ley, A.B. Pramod, M. Croft, K.S. Ravichandran, J.P. Ting. How Mouse Macrophages Sense What Is Going On. *Front Immunol*. 7 (2016) 1-17.
- [26] Z. Jiang, L. Zhu. Update on the role of alternatively activated macrophages in asthma. *Asthma Allergy*. 9 (2016) 101-107.
- [27] A.K. Sarvári, Z. Veréb, I.P. Uray, L. Fésüs, Z. Balajthy. Atypical antipsychotics induce both proinflammatory and adipogenic gene expression in human adipocytes *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun*. 450 (2014) 1383-1389.

4.2 MANUSCRITO

The antipsychotic Ziprasidone has cito-genotoxic and pro-inflammatory effects influenced by Val16Ala-SOD2 gene polymorphism

Thiago Duarte¹, Fernanda Barbisan², Verônica Farina Azzolin², Marta Maria Medeiros Frescura Duarte³, Ivo Emilio da Cruz Jung^{1,4}, Euler Esteves Ribeiro⁴, Ivana Beatrice Mânica da Cruz.^{1,2*}

¹ Postgraduate Program of Pharmacology, Federal University of Santa Maria (UFSM), Santa Maria-RS, Brazil

² Posgraduate Program of Gerontology, Federal University of Santa Maria (UFSM), Santa Maria-RS, Brazil

³ Center of Health Sciences, Lutheran University of Brazil (ULBRA)I, Santa Maria-RS, Brazil

³ Foundation Open University of the Third Age, FUNATI, Manaus-AM, Brazil

*Corresponding author

Address for correspondence and reprints: Ivana Beatrice Mânica da Cruz, MSc, PhD, Laboratory of Biogenomics, Center of Health Sciences, Avenue Roraima 1000, Building 19, Chamber 3102, Santa Maria, RS, Brazil Zip Code 97105-900. Phone: 55-55-91199099; Fax: 55-55-32208239. Email: ibmcruz@hotmail.com

Abstract

In immune cells, especially macrophages some oxidant molecules present a key role on inflammatory response trigger by pathogens and non-pathogens substances. For this reason, basal genetic superoxide-hydrogen peroxide (S-HP) imbalance as caused by Val16Ala-SOD2 single nucleotide polymorphism (SNP) could has some influence on side effects induced by pharmacological drugs. This could be de case of Ziprasidone (ZIP), a second-generation antipsychotic (SGA) used to treat some psychiatric and neurodegenerative diseases that seems to act on oxidative-inflammatory metabolism. To test this hypothesis, an *in vitro* study using human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) carrying different Val16Ala-SOD2 genotypes was performed. In standardized 72h cell cultures, the effect of ZIP exposure at plasmatic therapeutic concentration in oxidative (including level of DNA oxidation quantified by 8-deoxiguanosine) and inflammatory markers were analysed. Results showed that AA-PBMCs that have basal higher HP levels presented cito-genotoxic effect when ZIP-exposed, whereas VV-PBMCs presented higher levels of proinflammatory cytokines. The whole of results indicated some pharmacogenomic action of Val16Ala-SOD2 SNP despite in vitro methodological constrains.

Key-words : Pharmacogenomics, oxidative stress, inflammation, gene polymorphis, antipsychotics

INTRODUCTION

Psychosis symptoms have important association with schizophrenia and, bipolar disorders also affecting patients with other neurodegenerative diseases, such as Parkinson [1], dementias [2] been associated with stress response blood biomarkers and inflammation as well as on indicators of redox dysregulation, and DNA damage [3,4,5]. The pharmacological control of psychosis symptoms especially is conducted mainly from use of second-generation antipsychotics (SGAs). However, SGAs treatment has been also consistently associated metabolic side effects, such as obesity and, diabetes type 2 associated with peripheral oxi-inflammatory states [6,7,8]. However, these metabolic side effects seem to be attenuated by ziprasidone use (ZIP), a drug novel antipsychotic recently approved for clinical use [9].

ZIP is a bezidoxazole-derivative with effective action on positive and negative symptoms in the schizophrenia that is a selective monoaminergic antagonism by dopamine D2 and 5-HT_{2A} receptors, also presenting for 5-HT_{1A}, 2C, 1D receptors and by, 1- and 2- adrenergic, and H₁-histaminergic receptors inhibiting synaptic reuptake of serotonin and norepinephrine [9]. In pharmacokinetics terms, the absolute ZIP bioavailability at 20-mg oral dose is 60% under feeding condition. Plasmatic ZIP therapeutic range from 50 to ng/mL been highly metabolised in humans, with less than 5% of the administered dose being excreted in an unchanged form [10].

Despite, ZIP to present attenuated risk of development of metabolic diseases, other side effects associated with oxi-inflammatory states have been described in the literature including: allergic events associated hypersensitive reactions, chest pain and diffuse urticaria [11,12,13], respiratory failure [14], Kounis syndrome that is an allergic

reaction preceding and leading to an acute coronary syndrome [15], hypertensive reactions [16]. An *in vitro* study also described that ZIP could activate a RAW-macrophage cells line by induction of higher levels of cellular proliferation and proinflammatory cytokines such as IL-1, IL-6, TNF α , INF γ [17]. Although there are studies suggesting that this antipsychotic causes relevant cytogenetic changes, there is a need to clarify how much basal oxidative states of peripheral cells could affect both the cyto-genotoxic effects and the pro-inflammatory effects of this antipsychotic [18,19,20].

The relevance of this complementary study is associated with studies that suggest that baseline oxidative status could directly influence the risk of development of some non-transmissible chronic diseases, as well as drug and food response. This is the case of a single nucleotide polymorphism (SNP) located in the superoxide dismutase manganese dependent gene (Val16Ala-SOD2, rs4880) that its two homozygous genotypes (AA and VV) has been associated with chronic pro-inflammatory diseases [21,22] and that *in vitro* and *in vivo* studies indicated potential pharmacogenetic and nutrigenetic effects [23,24,25,26]. In this context, the present investigation performed *in vitro* analysis of potential ZIP effect on oxidative metabolism and inflammatory response of human PBMCs carrying different Val16Ala-SOD2 genotypes.

MATERIALS AND METHODS

Chemical reagents and equipments

The drugs and reagents used in the experiments, including Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM, 1640), RPMI 1640 culture mediums, ziprasidone and other chemical reagents, were purchased from Sigma-Aldrich (San Louis, MO, USA). Materials used in all cell cultures experiments were purchased from Vitrocell-Embriolife (Campinas, São Paulo, Brazil) and Gibco-Life Technologies (Carlsbad, CA, USA) including fetal bovine serum, heat-inactivated horse serum, penicillin and streptomycin. Molecular biology reagents were obtained from Qiagen (Hilden, North Rhine-Westphalia, Germany), Invitrogen (Carlsbad, CA, USA), and Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA). Vacutainer® was purchased from BD Diagnostics (Plymouth, UK) and cytokines kits for Elisa immunoassays were purchased from Biomyx Technology (San Diego, Ca, USA).

Val16AlaSOD2 SNP PBMCs and ZIP - General Protocol

Potential *in vitro* pharmacogenetic effects of Val16Ala-SOD2 SNP on PBMCs inflammatory response triggered by ZIP exposure was evaluated using blood samples of healthy subjects previously genotyped by this polymorphism. Barbisan et al [26] genotyped 120 healthy undergraduate students that accepted to donate blood samples as asked by researchers. All subjects signed consent term related to project previously approved by an Ethics Committee at the Universidade Federal de Santa Maria, Brazil (process number: 0332.0243.000-11). To ensure that all triplicate tests were performed, volunteers underwent more than one blood collection on different days.

The PBMCs from blood samples were obtained and prepared similar to the protocol described by Barbisan et al. [26]. Briefly, blood sample (20 mL/subject) were collected by venepuncture from 18 volunteers randomly selected from the original bank (20.49 years old) years old) carrying different Val16Ala-SOD2 genotypes (6-VV, 6AV and 6-AA). Therefore, the volunteers were not necessarily the same as those who took part in previous *in vitro* studies that investigated some effect of Val16Ala-SOD2 SNP.

However, it is important to point out that in the moment of study these volunteers were not intaking any medication for chronic disease treatment or vitamin supplements. Moreover, no-smokers, and did not present previous cardiovascular medical histories or hypertensive disorders, did not take psychiatric drugs, and had no metabolic disease or other morbidity that could affect the results. The Val16Ala-SOD2

genotype was determined by the polymerase chain reaction using a direct total blood cell sample and Tetra- Primer ARMS-PCR assay, as described by Barbisan et al. [48].

Blood samples collected were transferred to tubes containing Ficoll Histopaque (2:1) and centrifuged for 20 min at 900g in order to collect the PBMCs that were harvested in the interface. The PBMCs were washed with phosphate buffer by centrifugation and pelleted cells were transferred to culture medium containing 1 mL RPMI 1640 supplemented with 10% foetal calf serum (FCS) and 1% penicillin/ streptomycin at a cell density of 1×10^6 cells/mL. Further, PBMC cultures were incubated at 37°C and 5% CO₂ for 24 h before performing any experiment. PBMCs carrying different Val16Ala-SOD2 were exposed to ZIP at 75 ng/mL that is the estimated plasmatic therapeutic concentration of this drug and that previously Duarte et al [17] described pro-inflammatory effects on RAW macrophages cell. All analyses were performed in 72 h cell cultures.

Assessment of cellular proliferation

One of the characteristics of the activation of mononuclear cells is the increase in the rate of cellular proliferation in relation to a group of nonactivated cells. For this reason, in this protocol the proliferative rate in 72 h cell cultures was performed by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction spectrophotometric assay, as described previously by Barbisan et al. [42]. Briefly, MTT was dissolved in 5 mg/mL phosphate-buffered saline (PBS) and was added to a 96-well plate containing the sample treatments. Further, the plate was incubated for 1 h at 37°C. Culture supernatant was removed, and the cells were resuspended in 200 µL of dimethyl sulfoxide (DMSO). Reaction was spectrophotometrically read at 560 nm absorbance.

Oxidative stress markers assessments

The follow pro-oxidants molecules were quantified here: nitric oxide (NO), that is considered a key molecule in the early inflammatory response, that was spectrophotometric quantified by a colorimetric assay used to detect organic nitrate [8]. The Griess assay detects nitrite formed by the spontaneous oxidation of NO under physiological conditions involving azo coupling between diazonium species, which are derived from sulfanilamide and NO₂, and naphthylethylenediamine [8]. A colorimetric produce measure at 540 nm is obtained from this reaction that is proportional of NO level present in the sample. Barbisan et al [42] described detailed the NO quantification performed here.

As Val16Ala-SOD2 SNP is directly associated with imbalance of oxidative molecules (superoxide anion and hydrogen peroxide), in the first protocol were also quantified and compared the levels of follow variables associated with oxidative stress: lipid peroxidation (LPx) and protein carbonylation (PCarb). LPx was spectrophotometrically estimated through the formation of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) as previously described by Jentzsch et al. [46] and PCarb quantified according to Levine et al. [47] using 532 nm and 370 nm wavelengths, respectively.

Antioxidant and Immunological assays

The levels of 8-deoxyguanosine that is a marker of DNA oxidation (oxDNA), cytokines, antioxidant enzymes levels SOD, catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX) and IL-1, IL-6, TNF α and IL-10 were quantified in 72 h cell cultures in both protocols conducted with PBMCs and RAW macrophages. These measures were performed by immunoassay tests using Quantikine Human Immunoassays kits as

manufactures instructions. Briefly, all reagents and working standards were prepared and the excess microplate strips were removed, before adding 50 μL of the assay diluent RD1W to each well. Next these procedures, 100 μL 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 room temperature. Each well was subsequently aspirated and washed twice, for total of three washes. The antiserum of each molecule analysed here was added to each well and covered with a new adhesive strip before being incubated for 30 in at room temperature. The aspiration/wash step was repeated, and the conjugate of each antioxidant enzyme (100 μL) was added to each well and incubated for 30 min at room temperature. The aspiration/wash step was repeated before adding 100 μL of substrate solution to each well, followed by incubation at room temperature for additional 20 min. Finally, 50 μL of stop solution was added to each well and the optical density was determined within 30 min using a microplate reader set to 450 nm.

Statistical Analysis.

Data treatment obtention were performed according to *in vitro* good practices presumptions described by Griesinger et al. [21]. As currently is used, all assays were conducted in independent triplicate, and for this analysis data obtained were normalized by the mean of cell growth and transformed as % of control. Statistical analyses were performed using Graph Pad Prism Software (6.0 version). 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, because generally these outliers generate relative SD > 10% indicating presence of some experimental imprecision. software.

Comparison among treatments were performed by one- or two-way analysis of variance followed by Tukey's *post hoc* test. All tests comparisons with ≤ 0.05 were considered statistically significant. In results showed in Figures different letters identified statistical differences ($p \leq 0.05$) among treatments.

RESULTS

Analysis of PBMCs carrying different Val16Ala-SOD2 genotypes showed similar values of NO levels whereas, just V-cells (AV and VV) showed significant increase in the cellular proliferation. At contrary, AA-cells present lower values of cellular proliferation that AA-control group (Figure 1).

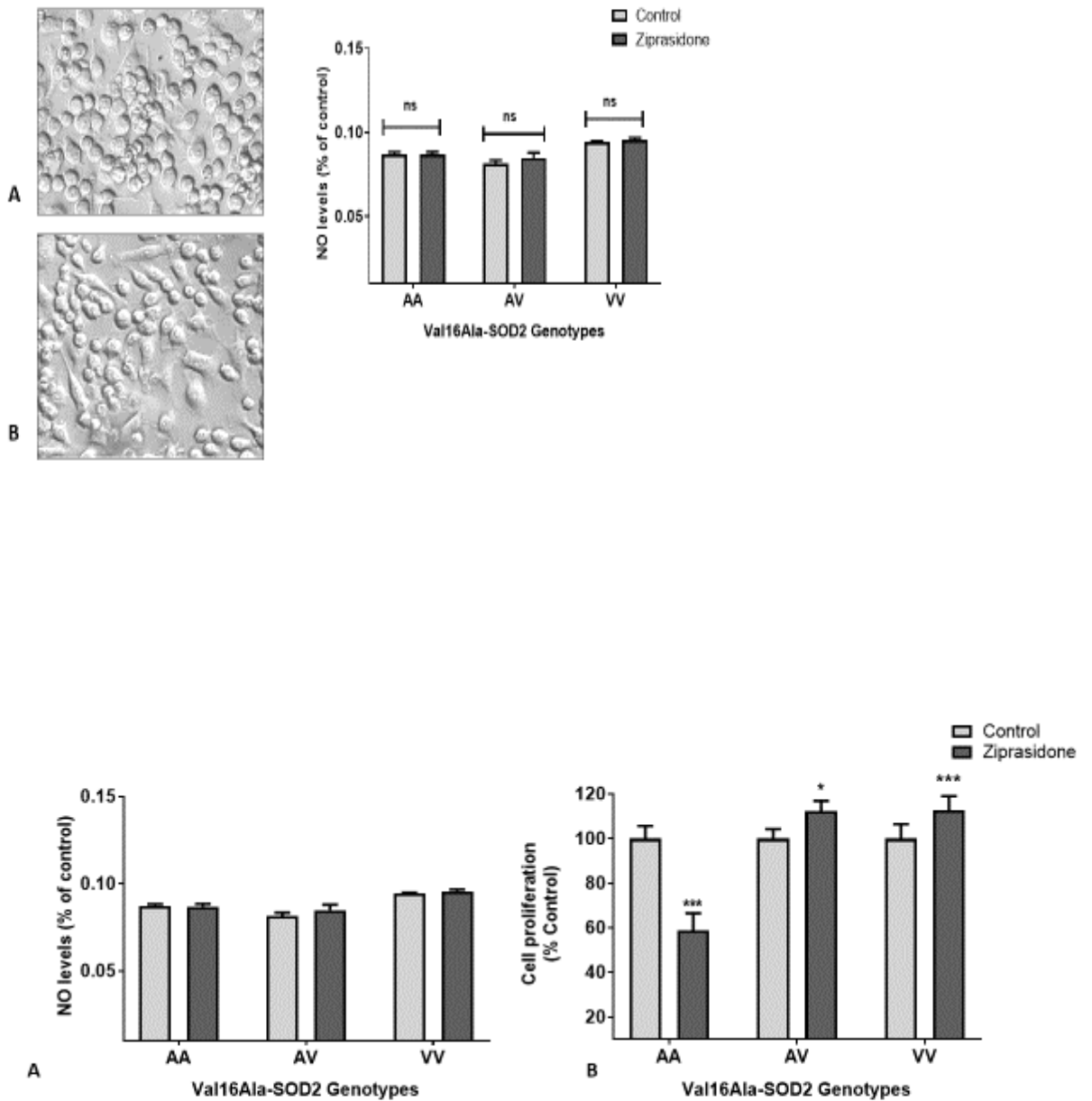


Figure 1 Comparison of (A) nitric oxide (NO) levels and (B) cellular proliferation rate in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) carrying different Val16Ala-SOD2 SNP genotypes (AA, AV and VV) ziprasidone (ZIP) exposed in 72h cell cultures by two-way analysis of variance followed by Tukey post hoc test. Data are presented by comparison between control and treated cells of each genotypes and statistically significant differences were identified by $p \leq 0.05 = *$; $p \leq 0.01 = **$ and $p \leq 0.001 = ***$.

The Figure 2 presents comparison between cytokines levels of 72 h ZIP-exposed and non-exposed PBMCs carrying different Val16Ala-SOD2 genotypes. The ZIP-exposure triggered higher levels of pro-inflammatory cytokines in PBMCs cells independent of SOD2 genotypes. However, this effect was slightly low in AA- than VV-cells. At contrary, a lowering effect of ZIP on IL-10 anti-inflammatory cytokine was observed when PBMCs. Again, this result was similar in all PBMCs cultures independent of Val16Ala-SOD2 genotype.

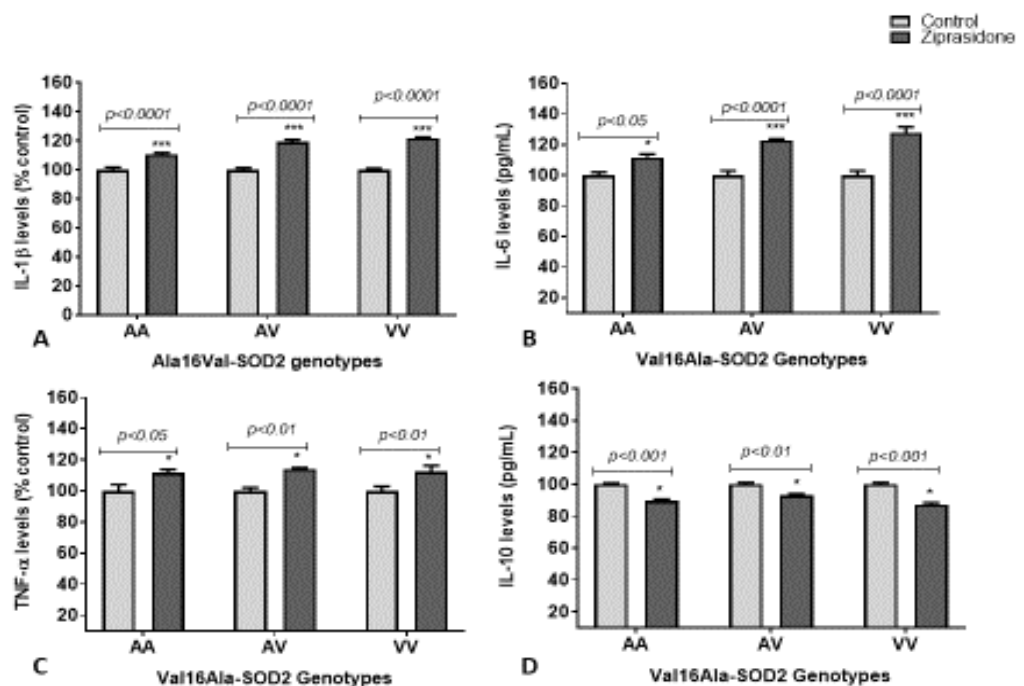


Figure 2 Comparison of different cytokines: (A) Interleukin 1 beta (IL-1β);(B) IL-6; (C) tumor necrosis factor alpha (TNFα) and (D) IL-10 in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) carrying different Val16Ala-SOD2 SNP genotypes (AA, AV and VV) ziprasidone (ZIP) exposed in 72h cell cultures by two-way analysis of variance followed by Tukey post hoc test. Data are presented by comparison between control and treated cells of each genotypes and statistically significant differences were identified by $p \leq 0.05 = *$; $p \leq 0.01 = **$ and $p \leq 0.001 = ***$.

The effect of ZIP on oxidative metabolism variables considering PBMCs carrying different Val16Ala-SOD2 genotypes are presented in Figure 3. ZIP induced significant higher levels of oxidative stress markers. Analysis indicated potential genotoxic action since levels of oxDNA were higher in all PBMCs ZIP-exposed. However, higher levels of this marker were observed in AA-PBMCs ZIP exposed (Figure 3A, 31 ± 3 % of control group) than AV-PBMCs (Figure 3B, 120 ± 4 % of control group) and VV-PBMCs (Figure 3C, 114 ± 3 of control) ($p \leq 0.001$). Despite ZIP trigger increase in the LPx levels, comparison among genotypes showed that this effect was lower in the AV-PBMCs (114 ± 3 of control group) than homozygous PBMCs (AA= 122 ± 2 and VV= 121 ± 2 of control) ($p \leq 0.001$). Protein carbonylation were elevated when cell cultures were ZIP-exposed, however, the increase in the levels of this oxidative markers were similar among SOD2 genotypes. The ZIP effect on antioxidant enzymes showed increase in the levels of SOD in a similar way among genotypes. At contrary, AA-PBMCs showed higher CAT levels in cultures ZIP-treated (124 ± 3 % of control) than V-allele cells (AV = 107 ± 2 , VV= 110 ± 3 % of control) ($p \leq 0.001$). On ZIP-exposure, GPX-levels were also higher in AA-PBMCs (124 ± 3 % of control) than V-allele cells (AV = 115 ± 2 , VV= 114 ± 3 % of control) ($p \leq 0.001$).

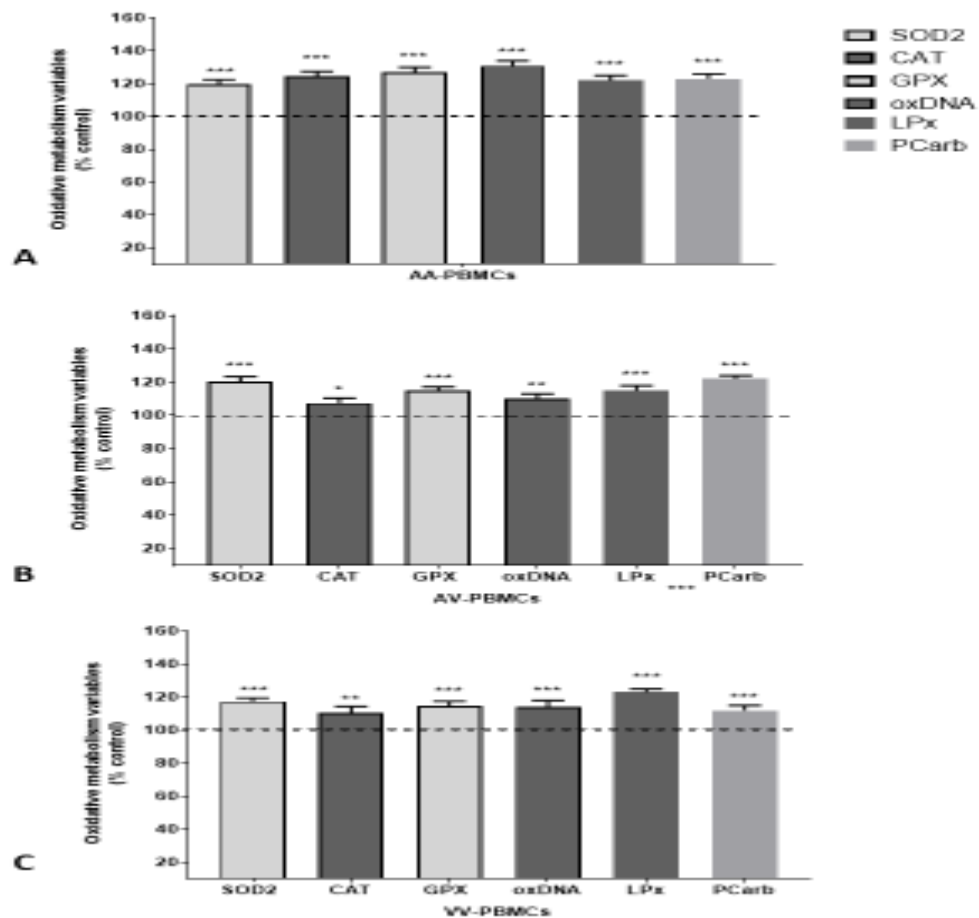


Figure 3 Comparison among different antioxidant enzymes and pro-oxidant markers in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) carrying different Val16Ala-SOD2 SNP genotypes (AA, AV and VV) ziprasidone (ZIP) exposed in 72h cell cultures by two-way analysis of variance followed by Tukey post hoc test. Data are presented by comparison between control and treated cells of each genotypes and statistically significant differences were identified by $p \leq 0.05 = *$; $p \leq 0.01 = **$ and $p \leq 0.001 = ***$. Considering that the data are represented as% of the control, the representation of the controls of each variable was done together, through a dashed line arranged in the value 100 of the y-axis.

DISCUSSION

In the present investigation was described potential pro-genotoxic and pro-inflammatory action of ZIP, an antipsychotic with attenuated metabolic alterations side effects. Moreover, these effects seem to be intensified by basal superoxide-hydrogen peroxide imbalance triggered by Val16Ala-SOD2 gene. In this case, whereas AA-

PBMCs present higher levels of some oxidative markers, including oxDNA, VV-PBMCs present higher levels of some inflammatory molecules than other genotypes.

Before these results to be discussed more deeply it is important to point out that, despite methodological limitations associated with *in vitro* studies, *in vivo* analysis of gene and diet influence on antipsychotic drugs represent a challenge since there are a great number of variables that can to influence the results and the data interpretation. For this reason, *in vitro* protocols could serve as an exploratory approach to infer genetic and environmental variables influence on inflammatory response triggered by antipsychotic drugs.

The protocol performed here that evaluated Val16Ala-SOD2 SNP influence on ZIP oxidative and inflammatory response was based in previous evidences suggesting occurrence of a basal superoxide-hydrogen peroxide imbalance determined by both homozygous genotypes, AA and VV. In the Val16Ala-SOD2 SNP, a change of valine (GTT) to alanine (GCT) on 16 codon causes a protein structural modification affecting the SOD2 non-active protein transport into mitochondria [27]. Therefore, this structural modification affects the SOD2 efficiency, since A-allele produces an alpha helix protein that ingress easily in to mitochondria became an active SOD2 enzyme, whereas V-allele produces a beta-sheet protein that is partially arrested in the mitochondrial membrane. In these terms, previous investigation estimated that AA produce approximately 40% more active SOD2 enzyme than VV genotype [27].

Although AA has higher SOD2 enzyme this phenotype is not beneficial considering that AA-SOD2 dismutates higher concentrations of superoxide anion in hydrogen peroxide but did not occur a concomitant elevation in the GPX levels that, subsequently catalyze hydrogen peroxide in water. The excess of basal hydrogen peroxide could be a key explanation for the association between AA genotype with risk

of several cancer types. A recent meta-analysis that included 33,098 cases and 37,831 controls from 88 studies estimated association between SOD2 SNP with overall cancer risk [28]. Previous studies also described that AA genotype could be more sensitivity to environmental prooxidant agents such as UV [29], methylmercury [30], moderate static magnetic fields [31] and others.

In this work, a drastic reduction in the number of cells 72 h cultures was initially observed. This result could indicate a strong immunosuppressive effect of ZIP on AA cells or a markedly cytotoxic effect. In this cell's higher levels of oxDNA that is a marker of DNA damage was observed than other V-allele cells. Other prooxidant molecules also presented high levels in AA-PBMCS as well as antioxidant enzymes. Other hand, high levels of proinflammatory cytokines occurred in AA-cells indicating a proinflammatory state. Therefore, the whole of results suggest that ZIP could present a cito-genotoxic effect on AA-PBMCs.

In the present investigation, VV-PBMCs presented higher production of inflammatory markers than A-allele cells when ZIP-exposed. The VV-genotype of Val16Ala-SOD2 SNP is related to low SOD2 efficiency that maintain elevate basal levels of superoxide anion in the cells. Despite superoxide to be less membrane soluble than hydrogen peroxide, this molecule has highly affinity for NO that is, virtually produced by all cells of the body. The reaction between superoxide anion and NO generates potent oxidative products, in especial peroxide nitrite that causes extensive peroxidation on lipid molecules present in the cellular membrane and other cellular compounds [21].

In fact, macrophages are very sensitive cells been are able to sense and clear structures that contain exogenous or endogenous pathogen-associated molecular pattern (PAMPs) and also danger-associated molecular patterns (DAMPs). These

properties are closely linked with production and regulation of potentially harmful oxidant molecules, as well as cytokines. For this reason, macrophages are important producer's superoxide/hydrogen peroxide and nitric oxide [32]. However, this production is highly controlled according the macrophage's status and microenvironmental condition. Therefore, elevated basal levels of superoxide could represent a greater sensitivity of macrophages to trigger and maintain a given inflammatory response. This process could explain the potential cause of the association between VV genotype and risk of several types of metabolic diseases related to chronic low-grade inflammation [21,22]. Among these we can cite hypercholesterolemia [33], obesity [34], cardiovascular diseases including angina pectoris [35] and stroke [36] and with diabetes type 2 complications risk including retinopathy, nephropathy [37,38] lipid profiles alteration [39,40].

Complementary *in vitro* and *in vivo* investigations showed that VV-genotype is associated with chronic inflammatory patterns including high levels of proinflammatory cytokines, such as IL-1 β , IL-6 and TNF α , and lower levels of IL-10, an anti-inflammatory cytokine [41,42]. Furthermore, investigations also has been described that VV-genotype could to has some pharmacogenomic influence on proinflammatory or anti-inflammatory response triggered by pharmacological drugs or bioactive molecules present in some foods. For example, a study performed by Duarte et al [23] showed that hypercholesterolemic patients who present a low-efficiency SOD2 enzyme (VV-genotype) exhibited an attenuated response to rosuvastatin compared with the A-allele patients. The effect of rosuvastatin on inflammatory and fibrinolytic biomarkers was also less intense in the VV patients. Barbisan et al [26] also described that Li anti-inflammatory *in vitro* effects could be directly influenced by Val16Ala-SOD2 SNP that was more attenuated in VV-PBMCs than A-allele cells.

Therefore, whole of results described here corroborate the potential proinflammatory ZIP effect on humans PBMC cells similar a previous study performed by Duarte et al in RAW macrophage cells [17]. Moreover, this effect has some differences according to unbalanced homozygous genotypes: AA or VV. Whereas basal higher hydrogen peroxide levels seems to potentialize ZIP genotoxic and oxidative stress action, in cells with basal higher superoxide anion occur a potentialization of inflammatory response by increase in the PBMCs proliferation and in the levels of proinflammatory cytokines.

The results described here suggest that both, homozygous Val16Ala-SOD2 genotypes could be associated with negative effects triggered by ZIP-intake. It is relevant to comment that, adverse drug reactions in patients causes more than 2 million hospitalizations including 100,000 deaths per year in the United States. These reactions are associated with multiple factors including genetic variables. For this reason, the pharmacogenomics concept was developed and consolidated in order to increase the efficacy and safety of pharmacological drugs. Generally, negative effects have been associated with detoxification cytochrome P450 genes [43,44]. However, the results described here also suggest a potential role of oxidative imbalance triggered by genetic factors on modulation of negative side effects of drugs, such as ZIP.

Despite *in vitro* methodological constrains results suggest that Val16Ala-SOD2 could present some pharmacogenomic action on ZIP side effects related to immune and oxidative metabolism. However, if this effect could be found in relation to other antipsychotics drugs is an open question that needs to be elucidated by future investigations. The results described here also indicate that it may be that environmental factors, such as the consumption of foods rich in bioactive molecules,

antioxidants and anti-inflammatories could attenuate the side effects in the immune system related ZIP-exposure.

ACKNOWLEDGMENTS

The grants and fellowships associated with this study was funded by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento do Ensino Superior (CAPES). The authors thank all Lab Biogenomic researchers, which gave some technical support to perform *in vitro* assays.

REFERENCES

- [1] R.B. Schneider, J. Iourinets, I.H. Richard, Parkinson's disease psychosis: presentation, diagnosis and management, *Neurodegener. Dis. Manag.* 7 (2017) 365–376. doi:10.2217/nmt-2017-0028.
- [2] K.L. Lanctôt, J. Amatniek, S. Ancoli-Israel, S.E. Arnold, C. Ballard, J. Cohen-Mansfield, Z. Ismail, C. Lyketsos, D.S. Miller, E. Musiek, R.S. Osorio, P.B. Rosenberg, A. Satlin, D. Steffens, P. Tariot, L.J. Bain, M.C. Carrillo, J.A. Hendrix, H. Jurgens, B. Boot, Neuropsychiatric signs and symptoms of Alzheimer's disease: New treatment paradigms, *Alzheimer's Dement. Transl. Res. Clin. Interv.* 3 (2017) 440–449. doi:10.1016/j.trci.2017.07.001.
- [3] S. Schiavone, L. Trabace, Inflammation, stress response, and redox dysregulation biomarkers: Clinical outcomes and pharmacological implications for psychosis, *Front. Psychiatry.* 8 (2017) 1-10. doi:10.3389/fpsy.2017.00203.
- [4] D. Fraguas, C.M. Díaz-Caneja, A. Rodríguez-Quiroga, C. Arango, Oxidative Stress and Inflammation in Early Onset First Episode Psychosis: A Systematic Review and Meta-Analysis, *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 20 (2017) 435–444. doi:10.1093/ijnp/pyx015.
- [5] E.S. Ershova, E.M. Jestkova, I.V. Chestkov, L.N. Porokhovnik, V.L. Izevskaya, S.I. Kutsev, N.N. Veiko, G. Shmarina, O. Dolgikh, S.V. Kostyuk, Quantification of cell-free DNA in blood plasma and DNA damage degree in lymphocytes to evaluate dysregulation of apoptosis in schizophrenia patients, *J. Psychiatr. Res.* 87 (2017) 15–22. doi:10.1016/j.jpsychires.2016.12.006.
- [6] J. Chen, X.F. Huang, R. Shao, C. Chen, C. Deng, Molecular mechanisms of antipsychotic drug-induced diabetes, *Front Neurosci.* 643 (2017). doi:10.3389/fnins.2017.00643.

- [7] R. Radhakrishnan, M. Kaser, S. Guloksuz, The Link between the Immune System, Environment, and Psychosis, *Schizop Bull.* 43 (2017) 693–697. doi:10.1093/schbul/sbx057.
- [8] I.E. Da Cruz Jung, A.K. Machado, I.B.M. Da Cruz, F. Barbisan, V.F. Azzolin, T. Duarte, M.M.M.F. Duarte, P.A.S. Do Prado-Lima, G.V. Bochi, G. Scola, R.N. Moresco, 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 (2016) 1715–1723. doi:10.1007/s00213-015-4079-7.
- [9] C. Mattei, M.P. Rapagnani, S.M. Stahl, Ziprasidone hydrochloride: what role in the management of schizophrenia?, *J Cent Nerv Syst Dis.* 3 (2011) 1-16. doi:10.4137/JCNSD.S4138.
- [10] M.C. Mauri, S. Paletta, C. Di Pace, A. Reggiori, G. Cirnigliaro, I. Valli, A.C. Altamura, Clinical Pharmacokinetics of Atypical Antipsychotics: An Update, *Clin. Pharmacokinet.* 57 (2018) 1493–1528. doi:10.1007/s40262-018-0664-3.
- [11] H.L. Ku, T.P. Su, Y.H. Chou, Ziprasidone-associated pedal edema in the treatment of schizophrenia, *Progr Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 30 (2006) 963-964. doi:10.1016/j.pnpbp.2006.01.020.
- [12] C. Akkaya, A. Sarandol, K. Aydogan, S. Kirli, Urticaria and angio-oedema due to ziprasidone, *J Psychopharmacol* 21. (2007) 550–552. doi:10.1177/0269881106075273.
- [13] E. Stip, S. Zhornitsky, H. Moteshafi, G. Létourneau, I. Stikarovska, S. Potvin, V. Tourjman, Ziprasidone for Psychotic Disorders: A Meta-Analysis and Systematic Review of the Relationship Between Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and Clinical Profile, *Clin Ther.* 33 (2011) 1853–1867. doi:10.1016/j.clinthera.2011.10.027.

- [14] C. Gresham, A.M. Ruha. Respiratory failure following isolated ziprasidone ingestion in a toddler, *J Med Toxicol.* 6 (2010) 41–43. doi:10.1007/s13181-010-0035-4.
- [15] L. Hamera, B.F. Khishfe, Kounis syndrome and ziprasidone, *Am J Emerg Med.* 35 (2017) 493–494. doi:10.1016/j.ajem.2016.11.061.
- [16] E.J. Phillips, W.H. Chung, M. Mockenhaupt, J.C. Roujeau, S.A. Mallal, Drug hypersensitivity: Pharmacogenetics and clinical syndromes, *J Allergy and Clin Immunol.* 127 (2011) 60-66. doi:10.1016/j.jaci.2010.11.046.
- [17] T. Duarte, F. Barbisan, P.A.S. do Prado-Lima, V.F. Azzolin, I.E. da Cruz Jung, M.M.M.F. Duarte, C.F. Teixeira, M.H. Mastella, I.B.M. da Cruz, Ziprasidone, a second-generation antipsychotic drug, triggers a macrophage inflammatory response in vitro, *Cytokine.* 106 (2018) 101–107. doi:10.1016/j.cyto.2017.10.017.
- [18] I. Karapidaki, M.T. Ekonomopoulou, K. Akritopoulou, D. Anestakis, Z. Iakovidou-Kritsi, Cytogenetic effects of valproic acid and ziprasidone in human lymphocyte cultures, *Neuropsychobiology.* 64 (2011) 219–223. doi:10.1159/000327604.
- [19] H. Kefelioğlu, Z.A. Şekeroğlu, G. Coşguner, S.K. Yedier, V. Şekeroğlu, Ziprasidone induces cytotoxicity and genotoxicity in human peripheral lymphocytes, *Drug Chem Toxicol* 40 (2017) 425–437. doi:10.1080/01480545.2016.1252920.
- [20] A. Dietrich-Muszalska, J. Kopka, B. Kontek, Polyphenols from Berries of *Aronia melanocarpa* reduce the plasma lipid peroxidation induced by ziprasidone, *Schizophr Res Treatment.* 2014. doi: 10.1155/2014/602390.
- [21] G. Bresciani, I.B.M. Cruz, J.A. De Paz, M.J. Cuevas, J. González-Gallego. The MnSOD Ala16Val SNP: Relevance to human diseases and interaction with environmental factors. *Free Radic. Res.* 47 (2013) 781–792. doi:10.3109/10715762.2013.836275.

- [22] G. Bresciani, I.B.M. da Cruz, J. González-Gallego, Manganese superoxide dismutase and oxidative stress modulation, *Adv Clin Chem.* 68 (2015) 87-130. doi:10.1016/bs.acc.2014.11.001.
- [23] T. Duarte, I.B.M. Da Cruz, F. Barbisan, D. Capelleto, R.N. Moresco, M.M.M.F. Duarte, The effects of rosuvastatin on lipid-lowering, inflammatory, antioxidant and fibrinolytics blood biomarkers are influenced by Val16Ala superoxide dismutase manganese-dependent gene polymorphism, *Pharmacogenomics J.* 16 (2016) 501–506. doi:10.1038/tpj.2015.91.
- [24] K.L. Schott, C.E. Assmann, F. Barbisan, V. F. Azzolin, B. Bonadiman, M.M.M.F. Duarte, A.K. Machado, I.B.M. da Cruz, Superoxide-hydrogen peroxide genetic imbalance modulates differentially the oxidative metabolism on human peripheral blood mononuclear cells exposed to seleno-L-methionine, *Chem. Biol. Interact.* 273 (2017) 18–27. doi:10.1016/j.cbi.2017.05.007.
- [25] D. Capeleto, F. Barbisan, V. Azzolin, E.B. Dornelles, F. Rogalski, C.F. Teixeira, A.K. Machado, F.C. Cadoná, T. da Silva, T. Duarte, M.M.M.F. Duarte, I.B.M. da Cruz, The anti-inflammatory effects of resveratrol on human peripheral blood mononuclear cells are influenced by a superoxide dismutase 2 gene polymorphism, *Biogerontology.* 16 (2015) 621–630. doi:10.1007/s10522-015-9561-4.
- [26] F. Barbisan, V.F. Azzolin, G.C. Monteiro, C.F. Teixeira, M.H. Mastella, V. Bueno, M.M.M.F. Duarte, G. Wagner, P.A.S. do Prado-Lima, E.E. Ribeiro, I.B.M. da Cruz, Genetic or pharmacological superoxide-hydrogen peroxide imbalances modulate the in vitro effects of lithium on glycogen synthase kinase-3 β , *Gene.* 655 (2018) 48–55. doi:10.1016/j.gene.2018.02.046.
- [27] A. Sutton, H. Khoury, C. Prip-Buus, C. Capanec, D. Pessayre, F. Degoul, The Ala16Val genetic dimorphism modulates the import of human manganese superoxide dismutase into rat liver mitochondria, *Pharmacogenetics.* 13 (2003) 145–157. doi:10.1097/00008571-200303000-00004.

- [28] P. Wang, Y. Zhu, S. Xi, S. Li, Y. Zhang, Association between *MnSOD* Val16Ala Polymorphism and Cancer Risk: Evidence from 33,098 Cases and 37,831 Controls, *Dis. Markers*. 2018 (2018) 1–16. doi:10.1155/2018/3061974.
- [29] G.F.F. dos Santos Montagner, M. Sagrillo, M.M. Machado, R.C. Almeida, C.P. Mostardeiro, M.M.M.F. Duarte, I.B.M. da Cruz, Toxicological effects of ultraviolet radiation on lymphocyte cells with different manganese superoxide dismutase Ala16Val polymorphism genotypes, *Toxicol. Vitro*. 24 (2010) 1410–1416. doi:10.1016/j.tiv.2010.04.010.
- [30] T.D. Algarve, F. Barbisan, E.E. Ribeiro, M.M.M.F. Duarte, M.F. Mânica-Cattani, C.P. Mostardeiro, A.F. Lenz, I.B.M. da Cruz, In vitro effects of Ala16Val manganese superoxide dismutase gene polymorphism on human white blood cells exposed to methylmercury, *Genet. Mol. Res.* 12 (2013) 5134–5144. doi:10.4238/2013.October.29.7.
- [31] E.B. Dornelles, B.D. Goncalves, K.L. Schott, F. Barbisan, T.C. Unfer, W.G. Glanzner, A.K. Machado, F.C. Cadona, V.F. Azzolin, M.A.E. Montano, J. Griner, I.B.M. da Cruz, Cytotoxic effects of moderate static magnetic field exposure on human periphery blood mononuclear cells are influenced by Val16Ala-MnSOD gene polymorphism, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24 (2017) 5078–5088. doi:10.1007/s11356-016-8176-x.
- [32] A.W.A. von Knethen, D. Fuhrman, N. Dehne, B. Brüne. Redox-signals and macrophage biology, *Mol Aspects Med.* 63 (2018) 70-87. doi: 10.1016/j.mam.2018.01.003.
- [33] M.M.M.F. Duarte, R.N. Moresco, T. Duarte, A. Santi, M.D. Bagatini, I.B.M. da Cruz, M.R.C. Schetinger, V.L. Loro, Oxidative stress in hypercholesterolemia and its association with Ala16Val superoxide dismutase gene polymorphism, *Clin. Biochem.* 43 (2010) 1118–1123. doi:10.1016/j.clinbiochem.2010.07.002.
- [34] M.A.E. Montano, J.P. Barrio Lera, M.G.V. Gottlieb, C.H.A. Schwanke, M.I.U.M. Rocha, M.F. Manica-Cattani, G.F. Santos, I.B.M. da Cruz, Association between

manganese superoxide dismutase (MnSOD) gene polymorphism and elderly obesity, *Mol. Cell. Biochem.* 328 (2009) 33–40. doi:10.1007/s11010-009-0071-z.

[35] H. Fujimoto, H. Kobayashi, K. Ogasawara, M. Yamakado, M. Ohno, Association of the manganese superoxide dismutase polymorphism with vasospastic angina pectoris, *J. Cardiol.* 55 (2010) 205–210. doi:10.1016/j.jjcc.2009.10.011.

[36] A.E. Flores, E.T. Pascotini, A. Kegler, P. Gabbi, G.V. Bochi, F. Barbisan, T. Duarte, A.L.C. Prado, M.M.M.F. Duarte, I.B.M. da Cruz, R.N. Moresco, A.R.S. Santos, G. Bresciani, L.F.F. Royes, M.R. Figuera, ALA16VAL-MnSOD gene polymorphism and stroke: Association with dyslipidemia and glucose levels, *Gene.* 627 (2017) 57–62. doi:10.1016/j.gene.2017.05.055.

[37] A. Möllsten, A. Jorsal, M. Lajer, N. Vionnet, L. Tarnow, The V16A polymorphism in SOD2 is associated with increased risk of diabetic nephropathy and cardiovascular disease in type 1 diabetes, *Diabetologia.* 52 (2009) 2590–2593. doi:10.1007/s00125-009-1550-1.

[38] C. Ter Chao, Y.C. Chen, C.K. Chiang, J.W. Huang, C.C. Fang, C.C. Chang, C.J. Yen, Interplay between Superoxide Dismutase, Glutathione Peroxidase, and Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma Polymorphisms on the Risk of End-Stage Renal Disease among Han Chinese Patients, *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016 (2016) 1-17. doi:10.1155/2016/8516748.

[39] K. Pourvali, M. Abbasi, A. Mottaghi, Role of superoxide dismutase 2 gene Ala16Val polymorphism and total antioxidant capacity in diabetes and its complications, *Avicenna J. Med. Biotechnol.* 8 (2016) 48–56.

[40] L. Huang, J. Lyu, Q.P. Liu, C. Chen, T. Wang, MnSOD Val16Ala polymorphism associated with retinopathy risk in diabetes: a PRISMA-compliant Meta-analysis of case-control studies, *Int J Ophthalmol.* 10 (2017) 639-645. doi: 10.18240/ijo.2017.04.22.

- [41] M.A.E. Montano, I.B.M. da Cruz, M.M.M.F. Duarte, C. C. Krewer, M.I.U.M. da Rocha, M.F.M Cattani, F.A.A. Soares, G. Rosa, A.F. Maris, F.G. Battiston, A. Trott, J.P.B. Lera, Inflammatory cytokines in vitro production are associated with Ala16Val superoxide dismutase gene polymorphism of peripheral blood mononuclear cells, *Cytokine*. 60 (2012) 30–33. doi:10.1016/j.cyto.2012.05.022.
- [42] F. Barbisan, V.F. Azzolin, E.E. Ribeiro, M.M.M.F. Duarte, I.B.M. da Cruz, The In Vitro Influence of a Genetic Superoxide-Hydrogen Peroxide Imbalance on Immunosenescence, *Rejuvenation Res.* 20 (2017) 334–345. doi:10.1089/rej.2016.1892.
- [43] B.S. Shastry, Pharmacogenetics and the concept of individualized medicine, *Pharmacogenomics J.* 6 (2006) 16–21. doi:10.1038/sj.tpj.6500338.
- [44] A. Tornio, J.T. Backman, Cytochrome P450 in Pharmacogenetics: An Update, *Adv. Pharmacol.* 83 (2018) 3–32. doi:10.1016/bs.apha.2018.04.007.
- [45] F. Barbisan, V.F. Azzolin, C.F. Teixeira, M.H. Mastella, E.E. Ribeiro, P.A.S. do Prado-Lima, R.S. Praia, M.M.M.F. Duarte, and Duarte, I.B.M. da Cruz, Xanthine-catechin mixture enhances lithium-induced anti-inflammatory response in activated macrophages in vitro, *Biomed Res Int* 2017 (2017). doi: 10.1155/2017/4151594.
- [46] A. M. Jentsch, H. Bachmann, P. Fürst, and H.K. Biesalski. 1996. Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids, *Free Radic Biol Med.* 20 (1996) 251–256.
- [47] R. L. Levine, D. Garland, C.N. Oliver, A. Amici, I. Climent, A.G. Lenz, B.W. Ahn, S. Shaltiel, E.R. Stadtman, Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins, *Methods Enzymol.* 186 (1990) 464–478.
- [48] F. Barbisan, J.de R. Motta, A. Trott, V.F. Azzolin, E.B. Dornelles, M. Marcon, T.D. Algarve, M.M.M.F. Duarte, C.P. Mostardeiro, T.C. Unfer, K.L. Schott, I.B.M. da Cruz, Methotrexate-Related Response on Human Peripheral Blood Mononuclear Cells May Be Modulated by the Ala16Val-SOD2 Gene Polymorphism. *PLoS One.* 9 (2014) e107299.

4.3 ARTIGO 2

The influence of a xanthine-catechin chemical matrix on *in vitro* macrophage-activation triggered by antipsychotic Ziprasidone

Concise Title: Effect of xanthine-catechin *in vitro* macrophage-activation by Ziprasidone

Thiago Duarte^{1.#}, Fernanda Barbisan^{2.#, *}, Beatriz Sadigurski Nunes da Cunha³, Verônica Farina Azzolin², Bárbara Osmarin Turra³, Marta Maria Medeiros Frescura Duarte⁴, Ivo Emilio da Cruz Jung¹, Euler Esteves Ribeiro⁵, Pedro Antônio do Prado-Lima⁶, Ivana Beatrice Mânica da Cruz^{1,2}

¹ Postgraduate Program of Pharmacology, Federal University of Santa Maria (UFSM), Santa Maria-RS, Brazil

² Postgraduate Program of Gerontology, Federal University of Santa Maria (UFSM), Santa Maria-RS, Brazil

³ Biogenomic Laboratory, Center of Health Sciences, Federal University of Santa Maria (UFSM), Santa Maria-RS, Brazil

⁴ Center of Health Sciences, Lutheran University of Brazil (ULBRA), Santa Maria-RS, Brazil

⁵ Foundation Open University of the Third Age, Manaus-AM, Brazil

⁶Brain Institute, Catholic University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

*Corresponding author

Address for correspondence and reprints: Fernanda Barbisan, MSc, PhD, Laboratory of Biogenomics, Center of Health Sciences, Roraima Avenue 1000, Building 19, Chamber 3102, Santa Maria, RS, Brazil Zip Code 97105-900. Phone: 55-55-91563712; Fax: 55-55-32208239. Email: fernandabarbisan@gmail.com ORCID: 0000-0002-2960-7047

These authors contributed equally in this study

Abstract— Ziprasidone (ZIP) is an effective antipsychotic with low side effects than other second-generation antipsychotics. Despite this, there are reports of adverse events and previous studies associating the use of ZIP the inflammatory response. It is possible to infer that bioactive molecules present in some foods could attenuate peripheral inflammatory and oxidative stress potentially triggered ZIP. This is the case of guaraná xanthine-catechin chemical matrix (XC-Mix) that presents caffeine, theobromine, and catechin. The in vitro protocols using murine RAW 264.7 cell macrophages were ZIP-exposure in culture medium supplemented with chemical isolated and admixture of Caf, The, and Cat. Main results showed that supplementation with isolated and XC-mix had a lowering effect on 72 h macrophages proliferation. XC-mix with 1:1:1 proportion at 25 µg/mL of each caffeine, theobromine, and catechin, molecules present lowering effect on nitric oxide levels, oxidative stress markers (DNA oxidation quantified by 8-hydroxy-2' -deoxyguanosine), lipoperoxidation, and protein carbonylation. XC-mix also decreased protein levels and downregulated genes of proinflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF- α). At contrary, XC-Mix increased levels and upregulated gene of anti-inflammatory IL-10 cytokine.

Key-words: caffeine; theobromine; catechin, *Paullinia cupana*; schizophrenia;

cytokine

BACKGROUND

Neuropsychiatric disturbs, such as schizophrenia, bipolar disorders, and also dementia, as well as psychosis symptoms related with these morbidities, have been associated with chronic neuroinflammation states [1–4]. Paradoxically, the use of most second-generation antipsychotics (SGAs) has been also consistently associated to metabolic side effects, highly related to chronic inflammatory morbidities, such as obesity and diabetes mellitus type 2, which are directly associated with low-grade peripheral inflammatory states [2, 3].

Despite these less intense effects in patients that intake ziprasidone (ZIP), previous investigations have described some side reactions immune dysfunctions with ZIP use including allergic events associated to hypersensitive reactions, chest pain and diffuse urticaria [4–6], hypertensive reactions [5], and respiratory failure [6]. Moreover, ZIP has been associated with Kounis syndrome development, which is an allergic reaction preceding and leading to acute coronary syndrome [7].

An *in vitro* study using a non-human RAW 264.7 macrophage cell lines confirmed that ZIP is able to activate inflammatory response inducing higher levels of proinflammatory cytokines, such as interleukin 1 (IL-1), interleukin 6 (IL-6), tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interferon gamma (IFN- γ), and decreasing in the antiinflammatory interleukin 10 (IL-10) cytokine levels [7]. The effects described in macrophage ZIP-exposed were similar to those found in these cells by exposure of phytohemagglutinin (PHA), a natural pro-inflammatory antigen. Furthermore, previous studies also described potential ZIP cytotoxic effects by increase of oxidative stress molecule on human peripheral blood mononuclear cells [7].

Considering that ZIP is an effective antipsychotic with low side effects than other SGAs, identification of a chemical matrix present in some dietary foods that modulates inflammatory states triggered by this drug could be clinically relevant. This is the case of xanthine molecules that includes caffeine and theobromine and also polyphenols that includes catechins found in some functional foods commonly consumed by population. This is the case of chemical matrix present in beverages, such as green and black tea [8], yerba mate [9] and guaraná [10, 11].

Guarana's (*Paullinia cupana*, Mart) is an Amazonian fruit whose seed toast is richest in caffeine and also has theobromine, another xanthine, and catechin polyphenols [12]. Guaraná powder is broadly used to produce energetic beverages in the world [12]. Previous in vivo and in vitro studies have described that guaraná extract could have some antioxidant [15, 16] and anti-inflammatory effects [13–16].

Therefore, it is possible that guaraná main XC-mix and their isolated molecules could have some antiinflammatory action against ZIP-macrophage activation. This hypothesis is based in previous investigation of guarana's XC-mix showed cryoprotectant effect in thawed human sperm by modulation of some oxidative stress markers [15]. Moreover, Barbisan et al. [16] described that similar XC-mix was able to improve anti-inflammatory Lithium effect on PHA activated-macrophages.

MATERIALS AND METHODS

Chemical Reagents and Equipment

In the present study, drugs and reagents used in the experiments, including Dulbecco modified Eagle medium (DMEM), caffeine, ziprasidone, catechin, and theobromine and other chemical reagents, were purchased from SigmaAldrich (San Louis, MO, USA). Materials used in all cell culture experiments were purchased from VitrocellEmbriolife (Campinas, São Paulo, Brazil) and Gibco-Life Technologies (Carlsbad, CA, USA) including fetal bovine serum, heat-inactivated horse serum, penicillin, and streptomycin. Quantikine kits for Elisa immunoassays were purchased from Biomyx Technology (San Diego, Ca, USA). Part of this in vitro study used commercial murine RAW 264.7 macrophage cells that were obtained from American Type Culture Collection (ATTC, Manassas, VA, USA) by the Cell Bank of Rio de Janeiro, which thawed and provided aliquots of these cells for the study. This non-profit non-governmental organization also issued a certificate that the line was not contaminated. The analyses involving the measurement of absorbance or fluorescence were conducted using SpectraMax i3x Multi-Mode Microplate Reader equipment (Molecular Devices, Sunnyvale, California, USA).

Xanthine-Catechin mixture and ZIP on RAW macrophages

This protocol was also performed using murine RAW 264.7 macrophages (ATCC TIB-71) as experimental model, and macrophages were cultured as described in Jung et al. [17]. Briefly, all protocols were performed at 37 °C in a 5% CO₂ incubator with cells cultured in DMEM medium supplemented with 10% fetal bovine serum, penicillin (100 U/mL), and streptomycin (100 mg/mL). Cells (1 × 10⁵) were seeded in

six-well plates and allowed to adhere for 24 h before receiving XC-matrix and ZIP supplementation. All analyses were performed in 72-h cell cultures and in triplicate.

Initially, the effect of isolated guarana's chemical matrix molecules on cellular proliferation of ZIP activated macrophages was evaluated in 72-h cell cultures. The range concentration of isolated molecules tested here was similar to Barbisan et al. [16], which also studied XCMix effect on activated-macrophage lithium-exposed: 0, 0.25, 50, 75, 100, and 200 $\mu\text{g/mL}$. From these results were produced and tested three potential XC-mix. The XC-mix reference concentration was based in the quantification of these bioactive molecules in a hydroalcoholic guaraná extract that was previously published by Bittencourt et al. [11] (caffeine = 12.240 mg/g, theobromine = 6.733 mg/g, and total catechins = 4.336 mg/mg). In this reference concentration, the estimated proportion was (3) caffeine, (2) theobromine, and (1) total catechins. Therefore, first XC1mix (3:2:1) of these molecules were added 75 caffeine, 50 theobromine, and 25 catechin $\mu\text{g/mL}$ concentrations in culture medium of macrophages. The second XC-2mix (2:1:1) was produced with an admixture containing 50 caffeine, 25 theobromine, and 25 catechin $\mu\text{g/mL}$ concentrations. The third XC-3 mix (1:1:1) was produced with an admixture containing similar concentrations of three isolated molecules (25 $\mu\text{g/mL}$).

Assessment of cellular proliferation

One of the characteristics of the activation of mononuclear cells is the increase in the rate of cellular proliferation in relation to a group of non-activated cells. For this reason, in both protocols the proliferative rate in 72 h cell cultures was performed by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction spectrophotometric assay, as described previously by Barbisan et al. [16]. Briefly, MTT was dissolved in 5 mg/mL phosphate-buffered saline (PBS) and was added to a 96-well plate containing the sample treatments. Further, the plate was incubated for 1 h

at 37°C. Culture supernatant was removed, and the cells were resuspended in 200 µL of dimethyl sulfoxide (DMSO). Reaction was spectrophotometrically read at 560 nm absorbance.

Nitric oxide and others oxidative stress markers assessments

In the two protocols were quantified the nitric oxide (NO), which is considered a key molecule in the early inflammatory response, which was spectrophotometrically quantified by a colorimetric assay used to detect organic nitrate [17]. The Griess assay detects nitrite formed by the spontaneous oxidation of NO under physiological conditions involving azo coupling between diazonium species, which are derived from sulfanilamide and NO₂, and naphthylethylenediamine. A colorimetric product measure at 540 nm is obtained from this reaction that is proportional of NO level present in the sample [17]. Barbisan et al. [16] described detailed the NO quantification performed here. Other oxidative markers studied here were lipid peroxidation (LPx) and protein carbonylation (PCarb). LPx was spectrophotometrically estimated through the formation of thiobarbituric acid reactive substances (TBARSs) as previously described by Jentzsch et al. [18] and PCarb quantified according to Levine et al. [19], using 532 and 370 nm wavelengths, respectively.

Immunological assays

The cytokines IL-1, IL-6, TNF-α, and IL-10 levels were quantified in 72-h cell cultures in both protocols conducted with PBMCs and RAW macrophages. The following variables associated with oxidative metabolism were also quantified just in the PBMC experiment: antioxidant enzyme levels SOD, catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX), and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) that is a marker of DNA oxidation (oxDNA). These measures were performed by immunoassay tests using Quantikine

Human Immunoassays kits as manufacturer instructions. Briefly, all reagents and working standards were prepared and the excess microplate strips were removed, before adding 50 μ L of the assay diluent RD1W to each well. Next these procedures, 100 μ 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 room temperature. Each well was subsequently aspirated and washed twice, for a total of three washes. The antibody of each molecule analyzed here was added to each well and covered with a new adhesive strip before being incubated for 30 in at room temperature. The aspiration/wash step was repeated, and the conjugate of each antioxidant enzyme (100 μ L) was added to each well and incubated for 30 min at room temperature. The aspiration/wash step was repeated before adding 100 μ L of substrate solution to each well, followed by incubation at room temperature for additional 20 min. Finally, 50 μ L of stop solution was added to each well and the optical density was determined within 30 min using a microplate reader set to 450 nm.

Cytokines gene expression assay

Modulation of cytokine gene expression was conducted here by qRT-PCR analysis using a similar approach to that described by Jung et al. [17]. Briefly, total RNA obtained from each treatment was isolated using TRIzol® reagent and quantified using a NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer System® (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA). Next, a cDNA was obtained using Script™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) following manufacturer's instructions. The qRT-PCR assay was performed with the Quanti Fast SYBR® Green PCR Kit (Qiagen, São Paulo, SP, Brazil) in a Rotor Gene® Q equipment (Qiagen, São Paulo, SP, Brazil). The specific forward and reverse primer sequences are described use here were: IL-1 β -F 5'GCGGCATC CAGCTACGAAT3'; R-5'ACCAGCATCTTCCTCA GCTTGT3'; IL-

6-f 5'TACCCCCAGGA GAAGATTC CA3'; R-5'CCGTCGAGGATGTACC GAATT3'; TNF α -F 5'CAACGGCATGGATCTCAAAGAC3'; R-5' TATGGGCTCATACCA GGGT TTG3'; IL-10-F 5' GTGATGCCCA AGCTGAGA3' R- 5'TGC TCTTG TTTTCACAGGGAAGA3'. The β -actin housekeeping gene was used as an internal control of gene expression analysis. Relative gene expression was calculated using the comparative Ct method and was expressed as fold expression relative to the control.

Statistical Analysis

Data treatments were performed according to in vitro good practice presumptions described by Griesinger et al. [21]. As currently is used, all assays were conducted in independent triplicate, and for this, analysis data obtained were normalized by the mean of cell growth and transformed as % of control [21]. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism software (6.0 version). 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, because generally, these outliers generate relative SD > 10% indicating presence of some experimental imprecision software. Comparison among treatments were performed by two-way analysis of variance followed by Bonferroni's post hoc test. All test comparisons with < 0.05 were considered statistically significant. In results showed in figures different letters identified statistical differences ($p < 0.05$) among treatments.

Results

Initially, a concentration curve of three isolated bioactive molecules tested here was performed in ZIP-activated macrophages evaluating the effect on cellular proliferation of 72-h cell cultures. All caffeine concentrations tested here showed inhibitory effect on cellular proliferation than just ZIP-exposed cultures (Fig. 1A). Theobromine exposure caused decreasing in the cellular proliferation just in the lower concentration (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Fig. 1B). Catechin triggered lower inhibitory cellular proliferation than caffeine and theobromine ($p < 0.001$) presenting a concentration-response effect. However, catechin at lower concentration (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was able to revert cellular proliferation to same levels than untreated control group (Fig. 1C). Results from three XC-mix proportions (Fig. 1D) showed that lower concentrations of each bioactive molecules were able to decrease ZIP-exposed macrophage proliferation in 72-h cell cultures (Fig. 1D).

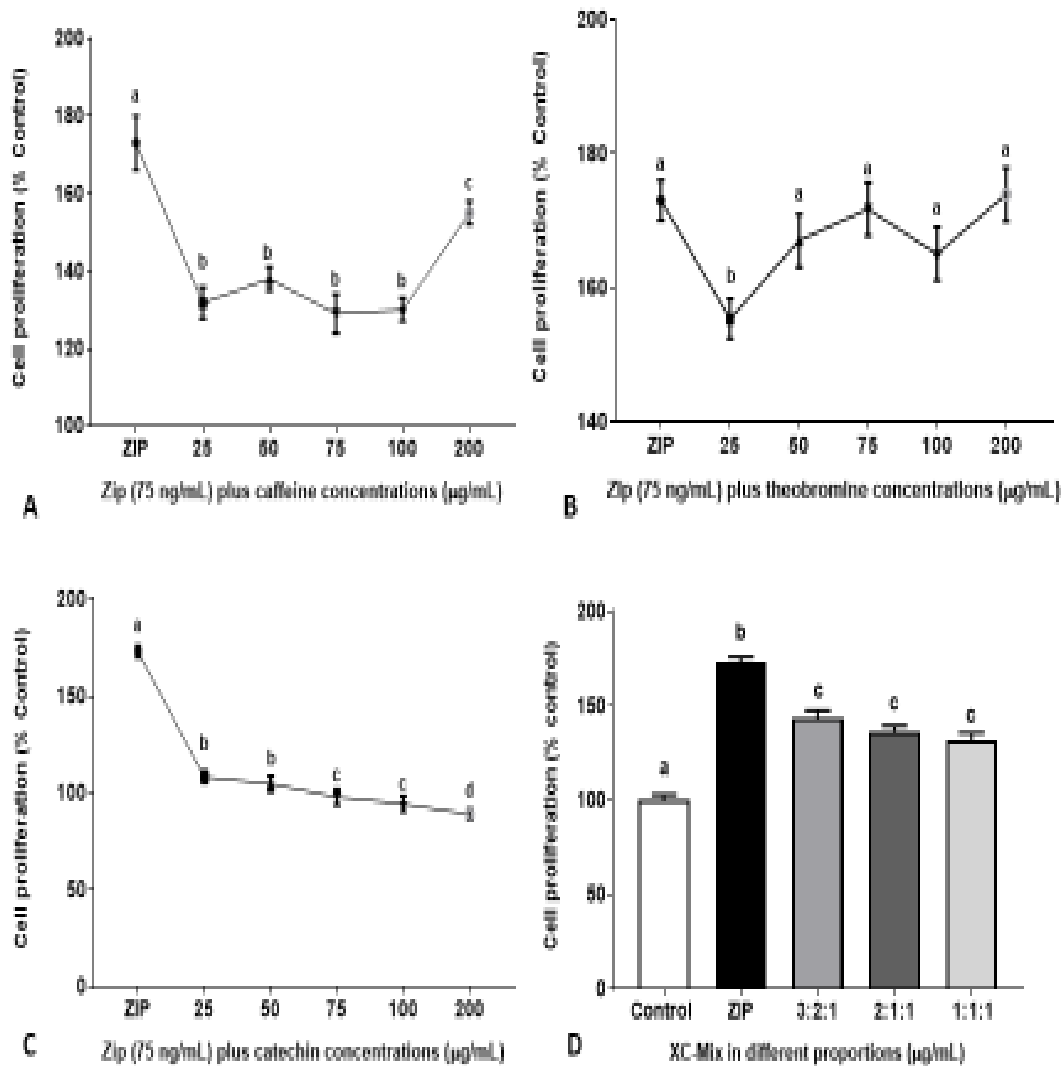


Figure 1- Effect of different concentrations of Ziprasidone and/or caffeine, theobromine, catechin, Xanthine and Catechin mixture on macrophage proliferation in 72-hours cell cultures. Effect of different ZIP concentrations on macrophage proliferation was analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Tukey post hoc test. Effect of different XC molecule concentrations on macrophage proliferation was analyzed by performing two-way ANOVA followed by the Bonferroni post hoc test. The different letters (a, b, c, and d) indicate statistical differences in each treatment at $p < 0.05$. Ziprasidone- ZIP . Xanthine and Catechin = XC Mixture= Mix

The analysis of macrophage spreading in monolayer indicating some proinflammatory response was compared among treatments. An example of this evaluation is showed in Fig. 2A, B. From these results, a second complementary analysis was performed evaluating the effect of XC-Mix in 1:1:1 proportion on cellular proliferation and NO levels of 72-h cell cultures. In the present analysis, all isolated molecules and when put together (XC-Mix) in the ZIP-activated-macrophage cultures were able to reduce cellular proliferation (Fig. 2C). Similar results were observed on NO levels that decreased significantly in cultures exposed to X-C isolated and admixture molecules (Fig. 2D).

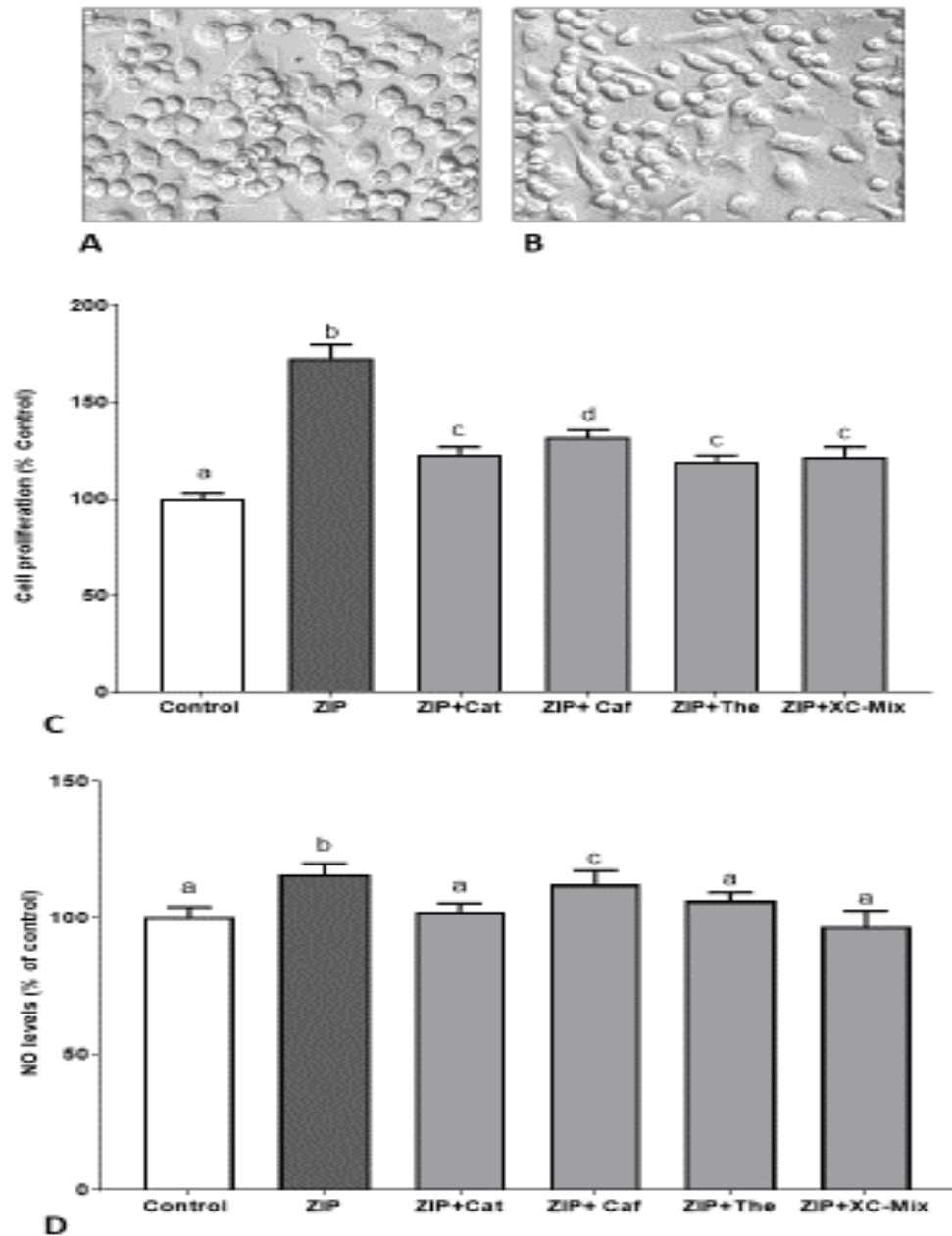


Figure 2- Macrophage activation and proliferation. A- RAW 264.7 monocyte inactivated cells ($\times 40$), scale bar=20 μm ; B macrophage activation observed by change of cell morphological patterns (arrow) ($\times 40$). C- Cell proliferation analysed by MTT test after 72 hours of the cell culture. D- Nitric Oxid levels determined by a modified Griess method quantifying nitrite/nitrate concentrations, after 72 hours of the cell culture. Results are presented as percentage of the untreated control group. Samples were statistically compared by two-way ANOVA analysis followed by the Bonferroni post hoc test. The different letters (a, b, c, and d) indicate statistical differences in each treatment at $p < 0.05$. Ziprasidone-ZIP . Xanthine and Catechin = XC Mixture= Mix

Considering that cellular proliferative inhibition could be caused by a cytotoxic effect, and not by an anti-inflammatory effect, some oxidative markers were also analyzed here. All markers tested here (oxDNA, LPX, PCarb) presented significant lower levels in macrophages ZIP-exposed that were cell cultures were XCmix supplemented (Fig. 3).

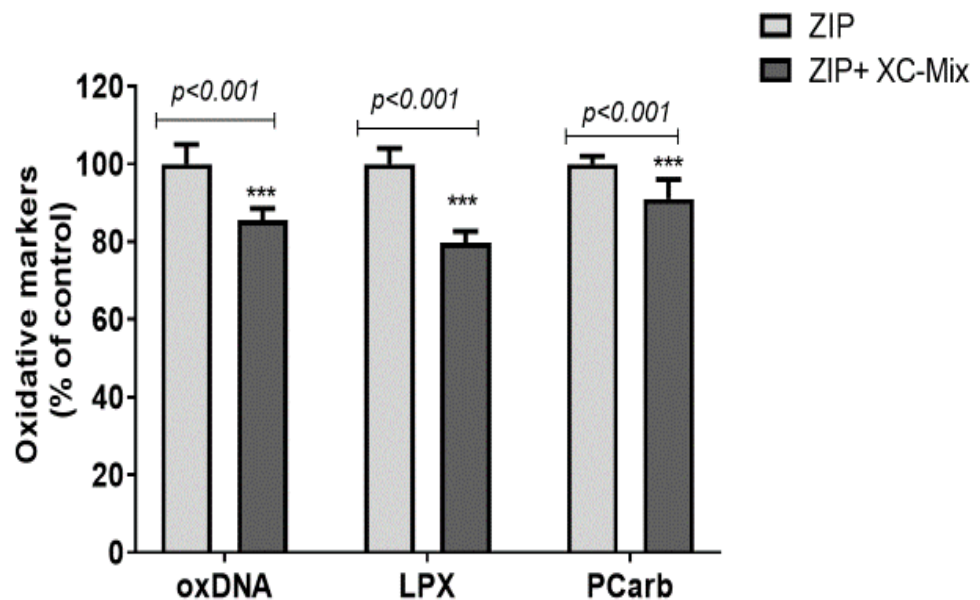


Figure 3- Comparison of changes in the levels of oxidative markers. 8-OHdG =DNA oxidation, LPX= Lipoperoxidation, PCarb= Carbonylation of proteins in macrophages treated with Ziprasidone (ZIP) isolated and Zip + xanthine–catechin (XC) mixture, incubated for 72 hours. Statistical analysis was performed using two-way analysis of variance followed by the Bonferroni post hoc test. The different letters (i.e., a, b) indicate statistical differences in each treatment at $p < 0.05$.

Finally, the effect of XC-mix in cytokine protein and gene expression levels of ZIP-activated macrophages was evaluated, and results are presented in the Fig. 4. Again, XC-Mix presented a significant lowering effect on proinflammatory cytokines, IL-1, IL-6, and TNF- α of ZIP-activated macrophages. At contrary, this exposure was able to elevate the IL-10 levels, an anti-inflammatory cytokine (Fig. 4A). The genes of proinflammatory cytokines were also downregulated, whereas IL-10 gene was upregulated in ZIP-activated macrophages concomitantly exposed to XC-Mix.

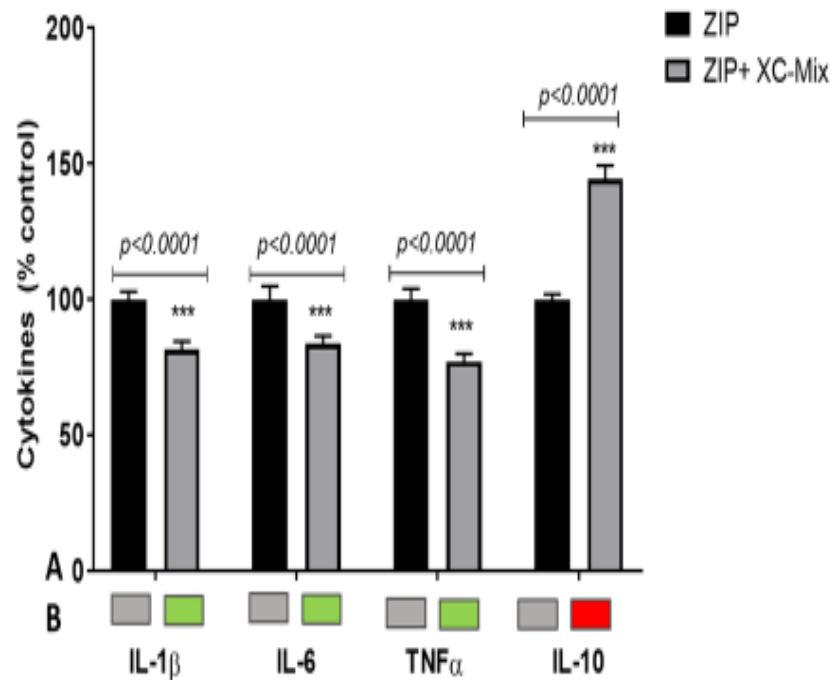


Figure 4- Effect of Ziprasidone and Xanthine-Catechin mixture cytokines proteic levels and gene expression. A- Cytokines proteic levels expression levels after 72 hours treatments. B- Gene expression levels after 24 hours treatments. Treatments were statistically compared by ANOVA two-Way followed by Bonferroni post hoc test. Different letters identified concentrations with significant differences calculated by post hoc test ($p < 0.05$). Gene expression of each cytokine are represented by coloured squares and were determined using untreated control group as reference to calculate the relative mRNA expression. The expression level of beta-actin was used as an internal control (housekeeping gene). Ziprasidone- ZIP . Xanthine and Catechin = XC Mixture= Mix

Discussion

Despite ZIP to be an antipsychotic with attenuated metabolic alteration side effects, a previous study showed that this drug could induce some peripheral inflammatory response as previously demonstrated by Duarte et al. [8]. However, it is possible that peripheral inflammatory triggered by ZIP antipsychotic seems to be modulated by bioactive molecules presented in some food beverages including guaraná. The results presented here corroborated this hypothesis, showing the inhibition of cellular proliferation in ZIP-activated macrophages and lowering effect on proinflammatory cytokines.

Before analysis of main results found here is important to comment some pharmacological properties of ZIP antipsychotic drug. This is a benzoxazole-piperidine (piperazine) derivative with relative recent approval for clinical use due to effective action on positive and negative symptoms in the schizophrenia. The ZIP presents a pleiotropic neural pathway action since it has selective monoaminergic antagonism by dopamine D2 and 5-HT_{2A} receptors and presents affinity for 5-HT_{1A}, 2C, 1D receptors and by 1- and 2- adrenergic and H₁-histaminergic receptors. Thereby, ZIP is able to inhibit synaptic reuptake of serotonin and norepinephrine [22].

Moreover, it is relevant to consider that macrophages are cells able to sense and respond to a great variety of stimuli and rapidly change their functional repertoire to meet the demands of the current microenvironment [22]. Due to this complex nature, macrophages present a diverse phenotype according its ontogeny and the tissue that these cells are located. Therefore, evidence have showed that mature macrophages retain a remarkable plasticity in their functional repertoires. This plasticity is a key of macrophage's function since these cells contribute directly and actively to restore

homeostasis under different microenvironmental conditions [23]. In these terms, it is highly likely that the presence of bioactive molecules with antioxidant and anti-inflammatory properties could act on macrophage activation.

Other important comment to be made here is respect of RAW 264.7 used here as experimental model of proinflammatory and anti-inflammatory agents. This model is originated from Abelson leukemia virus-transformed cell line BALB/c mice derived that has been used for more than 40 years. The RAW use in experimental in vitro studies is based in its capacity of performing pinocytosis and phagocytosis. Upon antigen stimulation, specially LPS, these cells increase NO production, other inflammatory cytokines, and cellular proliferation [25].

Taciak et al. [25] suggested that RAW cells closely mimic bone marrow-derived macrophages in terms of cell surface receptors. However, the RAW 264.7 use needs caution since their functional characteristics remains stable until 30th passage. In the present study, RAW macrophages are between the 18 and 24 cell culture passages. Results described here showed that polyphenols, such as catechins, could be useful to attenuate pro-inflammatory states triggered by ZIP on macrophages. These results are relevant since previous evidence has suggested that polyphenols are directly involved in modulation of mental health including action on behavior, mood, brain plasticity, and cognition. Specially in schizophrenia, a devastating mental disorder that causes chronic oxidative stress and neuroinflammatory states, direct interference of polyphenols could be useful. However, schizophrenia is a devastating mental disorder, with oxidative stress involved in its pathophysiology. The direct interference of polyphenols with schizophrenia pathophysiology has not been reported yet. However, increased oxidative stress caused by haloperidol was inhibited ex vivo by different polyphenols. Curcumin, extract from green tea and from Ginkgo biloba, may have

benefits on serious side effects associated with administration of neuroleptics to patients suffering from schizophrenia. Polyphenols in the diet have the potential to become medicaments in the field of mental health after a thorough study of their mechanism of action. The broad use of RAW 264.7 cells includes a relatively large number of studies involving effect of polyphenols present in several plant extracts or food. This is the case of study performed by PalaczWrobel et al. [26] that investigated the effect apigenin, kaempferol, and resveratrol on TNF α gene expression and protein secretion and IL-10. These bioactive molecules are present in several functional foods showing antioxidant and anti-inflammatory action. The study showed that all molecules were able to reduce the intensity of inflammatory processes by inhibition the secretion of pro-inflammatory TNF- α cytokine and increase the levels of an antiinflammatory IL-10 cytokine. A previous investigation also described that epigallocatechin gallate (EGCG) and other catechins have important anti-inflammatory activity on LPS-stimulated RAW macrophages [13, 27]. Duarte et al. [8] previously described that ZIP was able to induce inflammatory states similar to PHA-antigen exposure. Therefore, the results found here showing that isolate total catechin or in XC-mix could attenuate inflammatory response of ZIP activated macrophages corroborate these previous investigations. Unfortunately, we are not able to find in the literature reviewed previous studies involving the effect of polyphenols, in general on inflammatory response triggered by antipsychotic drugs.

In relation to xanthine, both caffeine and theobromine seems to present some anti-inflammatory effect. These results have been published in the literature, as a subclinical study performed by Kempf et al. [28]. In this investigation, habitual coffee drinkers refrained for 1 month from coffee drinking, and in the second month, they consumed four cups of filtered coffee each day. In the third month, these volunteers

consumed 8 cups of coffee (150 mL/cup). Biochemical marker analyses suggested that coffee consumption appears to present beneficial effects on subclinical inflammation, by cytokine modulation and HDLcholesterol.

However, there are some controversies in relation to caffeine especially considering the intake of beverages richest in this substance by subjects with psychotic symptoms. Biological effects linked to caffeine consumption is most determined from blocking action exerted by this molecule in all adenosine receptors located at the neurons and brain glial cells. Some animal studies described that caffeine plays a role opposite to dopamine in the striatum [28], and this action could be explained previous reports that have suggested potential association between schizophrenia and high caffeine, but not with low and moderate intake [12]. Some other studies reported that caffeine consumption was associated with smoking habit that is highly prevalent in schizophrenic patients, but not to symptomatology of this psychiatric disorder, including psychosis [29]. This is the case of an investigation performed in Spain was performed to clarify whether or not, after controlling for intervenient variables, such as tobacco smoking, the association between schizophrenia and caffeine intake would be consistent [30]. The authors showed high frequency of caffeinated beverages in schizophrenia patients than controls. However, smoking was directly associated with caffeine. The authors considered that lack of independent association between caffeine consumption and schizophrenia was surprising. Based in these controversies, as well as in general attenuating effect of the macrophage inflammatory response found in the three XC-Mix tested here, we decided to focus subsequent analyses on the matrix with similar concentration of caffeine, theobromine, and catechin. Therefore, it is possible to infer that the role of caffeine in psychotic symptoms could be dependent on the concentrations of this molecule, and perhaps its interaction with other bioactive

molecules present in a given food matrix. In contrast, this latter inference is still quite speculative and should be better investigated from complementary studies. However, in the present investigation, it is relevant to comment the general properties of theobromine, the other main xanthine present in guaraná matrix and also added in XC-matrix tested here. It is well established that caffeine has several beneficial effects range from alertness to reducing the risk of neurodegenerative diseases [30].

However, besides caffeine, other xanthines such as theobromine. This is the case of cocoa and guarana, the biological effect of theobromine being less studied than that of caffeine. Growing evidence obtained from previous studies suggest that theobromine has psychoactive actions in humans that are qualitatively different from those of caffeine [31]. For example, theobromine's effect on blood pressure is different from caffeine by not clarified reasons [32]. In fact, results described by Costa Krewer et al. [13] showed less prevalence of hypertension in Amazonian riparian elderly people that habitually intake guarana than others that never consumed this beverage containing guarana. Another important physiological theobromine effect is its vasodilator effect useful to treat asthma and other respiratory problems linked with high NO levels produced by inducible oxide nitric synthase 1 (NOS1) enzyme. In this investigation, theobromine supplement in macrophage ZIPexposure is able to revert NO levels for similar concentrations found in the control group. This effect was also found in cells just catechin-supplemented, whereas caffeine supplementation reverts just partially NO levels in comparison with ZIP group. Due its properties, there are reports that pharmacological use of pentoxifylline, a synthetic analogue of theobromine, presents attenuating effect on inflammation and stress oxidative states associated to acute lung injury by nitrogen mustard exposure [33]. The anti-inflammatory effect of pentoxifylline seems to be associated with its capacity to

competitively inhibit phosphodiesterases in a range of cells and tissues increasing intracellular cAMP, a second messenger which acts via protein kinase A. Subsequently, this biochemical reaction suppresses gene transcription of pro-inflammatory mediators including TNF α . Furthermore, evidence has suggested that pentoxifylline inhibitory phosphodiesterase effect could act directly on Toll-like receptor (TLR) that is an important molecule involved in the inflammatory response. The study that described this effect suggested that pentoxifylline could be used to prevent clinical conditions such as neonatal sepsis [34]. Furthermore, previous evidence also reported that theobromine has higher lung diffusion than other drugs used in the therapy of respiratory diseases and this is a differential aspect in relation to caffeine. Considering reports that ZIP could trigger side effects including hypersensitive and allergic reactions and respiratory failure [35], it is possible to infer that supplements richest in theobromine could be beneficial to attenuate these negative symptoms. It is also possible to speculate that XC-mix that present theobromine in its composition could act on important side effects triggered by other antipsychotics drugs. For example, olanzapine is SGA highly related to diabetes risk by apoptosis induction of betapancreatic cells. Pentoxifylline is considered an immunomodulatory and anti-inflammatory agent used to treat vascular disorders. This molecule inhibits proinflammatory cytokine production, and experimental studies such as that performed by Malekifard et al. [36] described that pentoxifylline has therapeutic effect against the autoimmune destruction of the pancreatic beta-cells induced by streptozotocin.

Conclusion

In conclusion, despite methodological constraints related to in vitro studies, the whole of results described here suggested that XC-matrix initially based in guaraná powder could present some beneficial action on peripheral proinflammatory effects ZIP-triggered. These results opened the perspective potential development of supplements or other pharmacological forms, including transdermal patches to minimize proinflammatory and oxidative stress effects associated with ZIP intake. It is possible to infer that this action could be also beneficial to attenuate other metabolic side effects related to SGAs use. Additional in vitro and in vivo investigations could test further this hypothesis.

Acknowledgments

PROEX/CAPES number 23038.005848/2018-31 for reading spectrophotometer (SpectraMax® i3x Multi-Mode Microplate Reader).

Availability of Data and Materials. All data generated or analyzed during the current study are included in this article.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

TD and FB designed the research and analyzed and interpreted the data; TD, FB, BSNC, VFA, BOT, and IBMC interpreted the data and wrote the paper; TD, FB, MMMFD, IECJ, and IBM analyzed and interpreted the data; EER and PASPL performed the research and analyzed the data; TD, FB, BSNC, VFA, BOT, and IBMC directed, designed, analyzed, and interpreted the data. All the authors read and approved the final manuscript.

FUNDING

This work was supported by the CNPq [Nos. 402325/ 2013-3; 490760/2013-9; 311446/2012-4] and CAPES for grants and fellowships. BConselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)^ and BCoordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)^ for Brazilian financial support.

COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS

Competing Interests. The authors declare that they have no competing interests. Ethics Approval. It is an in vitro work with the use of cell lines, there is no need for approval by the Ethics Committee. Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

REFERENCES

- [1] Khoury, R., and H.A. Nasrallah. 2017. Inflammatory biomarkers in individuals at clinical high risk for psychosis (CHR-P): State or trait? *Schizophrenia Research* 199: 31–38.
- [2] Chen, J., F.H. Xu, R. Shao, C. Chen, and C. Deng. 2017. Molecular mechanisms of antipsychotic drug-induced diabetes. *Frontiers in Neuroscience* 11: 643.
- [3] Rajiv, R., K. Muzaffer, and S. Guloksuz. 2017. The link between the immune system, environment, and psychosis. *Schizophrenia Bulletin* 43: 693–697.
- [4] Ku, H.L., T.P. Su, and Y.H. Chou. 2006. Ziprasidone-associated pedal edema in the treatment of schizophrenia. *Progress in NeuroPsychopharmacology and Biological Psychiatry* 30: 963–964.
- [5] Phillips, E.J., W.H. Chung, M. Mockenhaupt, J.C. Roujeau, and S.A. Mallal. 2011. Drug hypersensitivity: Pharmacogenetics and clinical syndromes. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 127 (3 Suppl): 60–66.
- [6] Gresham, C., and A.M. Ruha. 2010. Respiratory failure following isolated ziprasidone ingestion in a toddler. *Journal of Medical Toxicology* 6: 41–43.
- [7] Hamera, L., and B.F. Khishfe. 2017. Kounis syndrome and ziprasidone. *American Journal of Emergency Medicine* 35: 493–494.
- [8] Duarte, T., F. Barbisan, P.A.S. do Prado-Lima, V.F. Azzolin, I.E. da Cruz Jung, M.M.M.F. Duarte, C.F. Teixeira, M.H. Mastella, and I.B.M. da Cruz. 2018. Ziprasidone, a second-generation antipsychotic drug, triggers a macrophage inflammatory response in vitro. *Cytokine* 106: 101–107.
- [9] Pan, J., Y. Jiang, Y. Lv, M. Li, S. Zhang, J. Liu, Y. Zhu, and H. Zhang. 2018. Comparison of the main compounds in Fuding white tea infusions from various tea types. *Food Science and Biotechnology* 27: 1311–1318.
- [10] Souza, A.H.P., R.C.G. Corrêa, L. Barros, R.C. Calhelha, C. SantosBuelga, R.M. Peralta, A. Bracht, M. Matsushita, and I.C.F.R. Ferreira. 2015. Phytochemicals and bioactive properties of *Ilex paraguariensis*: An in vitro comparative study between the whole plant leaves and stems. *Food Research International* 78: 286–294.
- [11] Bittencourt, L.S., D.C. Machado, M.M. Machado, G.F. Dos Santos, T.D. Algarve, D.R. Marinowic, E.E. Ribeiro, F.A. Soares, F. Barbisan, M.L. Athayde, and I.B.M. Cruz. 2013. The protective effects of guarana extract (*Paullinia cupana*) on fibroblast NIH3T3 cells exposed to sodium nitroprusside. *Food and Chemical Toxicology* 53: 119–125.
- [12] Schimpl, F.C., J.F. da Silva, J.F. Gonçalves, and P. Mazzafera. 2013. Guarana: Revisiting a highly caffeinated plant from the Amazon. *Journal of Ethnopharmacology* 150 (1): 14–31.

- [13] Krewer, C.C., L. Suleiman, M.M.F. Duarte, E.E. Ribeiro, C.P. Mostardeiro, M.A.E. Montano, M.I.U. Marques da Rocha, T.D. Algarve, G. Bresciani, and I.B.M. da Cruz. 2014. Guaraná, a supplement rich in caffeine and catechin, modulates cytokines: Evidence from human in vitro and in vivo protocols. *European Food Research and Technology* 239: 49–57.
- [14] Werner, C., F.C. Cadoná, I.B.M. da Cruz, E.R.D.S. Flôres, A.K. Machado, M.R. Fantinel, G.C.C. Weis, C.E. Assmann, A.O. Alves, B.D.S.R. Bonadiman, E.E. Ribeiro, and M.A.E. Montano. 2017. A chemical compound based on methylxanthine-polyphenols lowers nitric oxide levels and increases post-thaw-human sperm viability. *Zygote* 25: 719–730.
- [15] Higgins, J.P., B. Kavita, P.A. Deuster, and J. Shearer. 2018. Energy Drinks: A Contemporary Issues Paper. *Currents Sports Medicine Report* 17: 65–72.
- [16] Barbisan, F., V.F. Azzolin, C.F. Teixeira, M.H. Mastella, E.E. Ribeiro, P.A.S. do Prado-Lima, R.S. Praia, M.M.F.D. Duarte, and Duarte, Barbisan, da Cunha, Azzolin, Turra, Duarte, da Cruz Jung, Ribeiro, do Prado-Lima, and da Cruz I.B.M. Cruz. 2017. Xanthine-catechin mixture enhances lithium-induced anti-inflammatory response in activated macrophages in vitro. *BioMed Research International* 2017: 4151594.
- [17] da Cruz Jung, I.E., A.K. Machado, I.B.M. Cruz, F. Barbisan, V.F. Azzolin, T. Duarte, M.M.F. Duarte, P.A.S. do Prado-Lima, G.V. Bochi, G. Scola, and R.N. Moresco. 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* 233: 1715–1723.
- [18] Jentsch, A.M., H. Bachmann, P. Fürst, and H.K. Biesalski. 1996. Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. *Free Radical Biology & Medicine* 20: 251–256.
- [19] Levine, R.L., D. Garland, C.N. Oliver, A. Amici, I. Climent, A.G. Lenz, B.W. Ahn, S. Shaltiel, and E.R. Stadtman. 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology* 186: 464–478.
- [20] Voiculescu, M., I. Ghiță, A. Segărceanu, I. Fulga, and O. Coman. 2014. Molecular and pharmacodynamic interactions between caffeine and dopaminergic system. *Journal of Medicine and Life* 7 (Spec Iss 4): 30–38.
- [21] Griesinger, C., B. Desprez, S. Coecke, W. Casey, and V. Zuang. 2016. Validation of Alternative In Vitro Methods to Animal Testing: Concepts, Challenges. Processes and Tools. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 132: 856–865.
- [22] Schott, K.L., C.E. Assmann, C.F. Teixeira, A.A. Boligon, S.R. Waechter, M.M.F. Duarte, and I.B.M. da Cruz. 2018. Brazil nut improves the oxidative metabolism of superoxide-hydrogen peroxide chemically-imbalanced human fibroblasts in a nutrigenomic manner. *Food Chemical and Toxicology* 121: 519–526.

- [23] Chiara, M., M.P. Rapagnani, and S.M. Stahl. 2011. Ziprasidone hydrochloride: what role in the management of schizophrenia? *Journal Of Central Nervous System Disease* 3: 1–16.
- [24] Weigert, A., A. von Knethen, D. Fuhrmann, N. Dehne, and B. Brüne. 2018. Redox-signals and macrophage biology. *Molecular Aspects of Medicine* 63: 70–87.
- [25] Taciak, B., M. Białasek, A. Braniewska, Z. Sas, P. Sawicka, L. Kiraga, T. Rygiel, and M. Król. 2018. Evaluation of phenotypic and functional stability of RAW 264.7 cell line through serial passages. *PLoS One* 13: e0198943.
- [26] Palacz-Wrobel, M., P. Borkowska, M. Paul-Samojedny, M. Kowalczyk, A. Fila-Danilow, R. Suchanek-Raif, and J. Kowalski. 2017. Effect of apigenin, kaempferol and resveratrol on the gene expression and protein secretion of tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and interleukin-10 (IL-10) in RAW-264.7 macrophages. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 93: 1205–1212.
- [27] Zhong, Y., Y.S. Chiou, M.H. Pan, and F. Shahidi. 2012. Antiinflammatory activity of lipophilic epigallocatechin gallate (EGCG) derivatives in LPS-stimulated murine macrophages. *Food Chemistry* 134: 742–748.
- [28] Kempf, K., C. Herder, I. Erlund, H. Kolp, S. Martin, M. Carstensen, W. Koenig, J. Sundvall, S. Bidel, S. Kuha, and T. Jaakko. 2010. Effects of coffee consumption on subclinical inflammation and other risk factors for type 2 diabetes: a clinical trial. *The American Journal of Clinical Nutrition* 91: 950–957.
- [29] Gandhi, K.K., J.M. Williams, M. Menza, M. Galazyn, and N.L. Benowitz. 2010. Higher serum caffeine in smokers with schizophrenia compared to smoking controls. *Drug and Alcohol Dependence* 110: 151–155.
- [30] Ribeiro, J.A., and A.M. Sebastião. 2010. Caffeine and adenosine. *Journal of Alzheimer's Disease* 20 (Suppl 1): S3–S15.
- [31] Martínez-Pinilla, E., A. Oñatibia-Astibia, and R. Franco. 2015. The relevance of theobromine for the beneficial effects of cocoa consumption. *Frontiers in Pharmacology* 20: 6–30.
- [32] Mitchell, E.S., M. Slettenaar, N. vd Meer, C. Transler, L. Jans, F. Quadt, and M. Berry. 2011. Differential contributions of theobromine and caffeine on mood, psychomotor performance and blood pressure. *Physiology and Behaviour* 104: 816–822.
- [33] Sunil, V.R., K.N. Vayas, J.A. Cervelli, R. Malaviya, L. Hall, C.B. Massa, A.J. Gow, J.D. Laskin, and D.L. Laskin. 2014. Pentoxifylline attenuates nitrogen mustard-induced acute lung injury, oxidative stress and inflammation. *Experimental and Molecular Pathology* 97: 89–98.

- [34] Almario, B., S. Wu, J. Peng, D. Alapati, S. Chen, and I.R. Sosenko. 2012. Pentoxifylline and prevention of hyperoxia-induced lung - injury in neonatal rats. *Pediatric Research* 71: 583–589.
- [35] Ashraf, S., W. Graham, and H. Hayreh. 2018. A Case of Ziprasidone-Induced Hypersensitivity Pneumonitis: A Previously Unreported Side Effect of an Atypical Antipsychotic. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 197: A6941.
- [36] Malekifard, F., N. Delirezh, R. Hobbenaghi, and H. Malekinejad. 2015. Immunotherapeutic effects of pentoxifylline in type 1 diabetic mice and its role in the response of T-helper lymphocytes. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* 18: 247–252.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou *in vitro* o efeito da ZIP na resposta oxidativo-inflamatória de células imunes avaliando a potencial influência do polimorfismo genético Val16Ala-SOD2 e da matriz química do guaraná neste polimorfismo. Os resultados deste estudo que serão discutidos podem ser considerados relevantes, tendo em vista que a literatura apresenta inconsistências relacionadas à ação da ZIP na resposta geno-oxidativo-inflamatória em pacientes acometidos por SCZ.

No primeiro trabalho, foi avaliado o efeito potencial da ZIP, uma droga antipsicótica na resposta inflamatória usando uma linhagem comercial de macrófagos RAW 264.7 como um modelo experimental *in vitro*. Os resultados mostraram que em células não ativas da linhagem comercial, a ZIP induziu uma resposta inflamatória. Esta sugestão baseia-se na observação de processos de espalhamento de macrófagos e proliferação celular aumentada pela ZIP que foram avaliados por dois protocolos (ensaios de MTT e análise de ciclo celular por citometria de fluxo).

As células expostas a este medicamento também apresentaram níveis elevados de moléculas oxidantes relacionadas à resposta inflamatória (ON, EROs e $O_2^{\bullet -}$) e citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, TNF α , IFN γ) e níveis diminuídos de IL-10, uma citocina anti-inflamatória. Entretanto, os macrófagos expostos a ZIP apresentaram níveis inflamatórios inferiores em comparação com as células expostas à PHA, um antígeno de lectina encontrado em algumas plantas. Devido as suas propriedades antigênicas, a PHA é responsável pela indução de mitose e ativação de cascata inflamatória em células mononucleares (linfócitos T e macrófagos) (KIM et al., 2011).

Para nossa melhor compreensão, esse é o primeiro estudo onde o efeito potencial da ZIP na resposta inflamatória de macrófagos é analisado. De fato, a ZIP induziu o espalhamento de macrófagos, mitose e a modulação de algumas moléculas oxidativas que estão diretamente relacionadas com a inflamação, especialmente o ânion $O_2^{\bullet -}$ corroborando os resultados encontrados por Azzolin e colaboradores (2016). Além disso, um significativo aumento das citocinas pró-inflamatórias também foi observado nas células tratadas com este fármaco.

É importante ressaltarmos que o lítio (Li) foi utilizado como uma molécula anti-inflamatória devido sua capacidade inibitória sobre a síntese de prostaglandinas e a

atividade da enzima glicogênio sintase quinase-3 β , responsável por facilitar a transcrição do fator nuclear kappa β (NF- $\kappa\beta$), um importante marcador de processo inflamatório (NASSAR & AZAB, 2014).

A polifarmácia ou terapia múltipla de fármacos é bastante comum no tratamento psiquiátrico de pacientes, especialmente nos distúrbios bipolares com alto risco de carga familiar para comportamento suicida (MOSSER & EDWARDS, 2008). Diante disso, nosso estudo testou a potencial interação entre a ZIP e o LI na resposta inflamatória de macrófagos. Em geral, esta associação atenuou os efeitos inflamatórios observados em células tratadas apenas com ZIP. Apesar da associação entre Li e ZIP não ser considerada como primeira escolha no tratamento clínico, nossa investigação sugere a partir dos dados obtidos que a concomitância destes psicofármacos podem melhorar a resposta inflamatória periférica atribuída ao uso isolado de ZIP. No entanto, ensaios clínicos complementares precisam ser realizados para confirmar os resultados aqui descritos.

O potencial efeito inflamatório da ZIP descrito aqui está de acordo com estudos prévios conduzidos por Lister e colaboradores (2015) que verificaram que após três meses de tratamento realizado com ZIP, os pacientes apresentaram níveis elevados de proteína C reativa (CRP), moléculas de adesão celular (ICAM-1), moléculas de adesão vascular (VCAM-1) e E-selectina em comparação com os níveis basais, apesar destes valores serem inferiores ao de pacientes tratados com outros antipsicóticos atípicos como quetiapina, olanzapina e risperidona. Também foram relatados casos de hipersensibilidade atrelados com a ZIP (KU et al., 2006; AKKAYA et al., 2007; KIM et al., 2014; HAMERA & KHISHFE, 2017).

Os macrófagos podem ser considerados como células vitais em ambos os processos de imunidade inata e adaptativa e essenciais para manifestações de inflamação alérgica (MOHAMMAD & OSSER, 2014). Geralmente, são os primeiros a detectarem e responderem a distúrbios em grande parte do corpo humano. Apesar da diferença entre os macrófagos em diferentes tecidos, estas células apresentam muitos receptores em comum que ajudam a detectarem essas anormalidades (LEY et al., 2016).

A exposição aos antígenos pode engatilhar a polarização de macrófagos em clássicos ativos (células M1, as quais apresentam as citocinas pró-inflamatórias IL-1, IL-6, TNF α e IFN γ) e alternativos ativos (células M2 que apresentam citocinas anti-inflamatórias, tais como a IL-10) (JIANG & ZHU, 2016).

O efeito farmacogenômico da ZIP nos genes das citocinas também foi observado em nossos resultados. Foi observado que a ZIP não só exerceu um aumento de regulação sobre as citocinas pró-inflamatórias, como também realizou esta função em citocinas anti-inflamatórias. Este resultado torna-se relevante, pois sugere a ocorrência da polarização de macrófagos M1 a M2, principalmente em comparação aos resultados com o antígeno de PHA, que mostrou uma redução na regulação de IL-10. Estes resultados entram de acordo aos obtidos por Sarvári e colaboradores (2014), no qual foi observada a regulação da expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias pela ZIP em células tronco derivadas de adipócitos humanos (SARVÁRI et al., 2014). Os resultados obtidos nas culturas confirmaram que a ZIP pode apresentar um efeito pró-inflamatório que pode ser parcialmente revertido pela exposição concomitante de Li. Em resumo, nossos dados sugerem que a ZIP poderia induzir alguma resposta inflamatória. Nós especulamos que a resposta inflamatória desencadeada pela ZIP pode estar associada a efeitos colaterais alérgicos em relatos de casos clínicos descritos na literatura. No entanto, a confirmação requer investigações complementares a serem realizadas. Portanto, apesar das restrições metodológicas associadas aos estudos *in vitro*, nosso estudo sugere que a ZIP poderia desenvolver uma resposta inflamatória.

Embora esses resultados possam ser considerados relevantes para compreender o efeito de ZIP na modulação inflamatória, a presente investigação é limitada por algumas restrições metodológicas associadas com estudos *in vitro* e com o fato de que não foi utilizado nenhum outro modelo *in vivo*, tais como células mononucleares do sangue periférico humano (CMSPs). As CMSPs são consideradas um bom modelo para estudar a modulação inflamatória por drogas experimentais e mais estáveis. O polimorfismo da SOD2 causa um desequilíbrio oxidativo mitocondrial. Por esta razão, ambos os genótipos homozigóticos AA e VV são associados ao aumento do risco de várias doenças crônicas não transmissíveis (BARBISAN et al., 2014; BRESCIANI; DA CRUZ & GONZÁLEZ-GALLEGO, 2015; CAPELETO et al., 2015). Portanto, a influência do polimorfismo poderia ser considerada uma importante variável.

O segundo trabalho que compõe este estudo avaliou o efeito do polimorfismo Val16Ala-SOD2 na resposta inflamatória, de estresse oxidativo e pró-genotóxica da ZIP em CMSPs humanos. Além disso, estes efeitos parecem ser intensificados por um desbalanço basal de S-HP engatilhado pelo gene Val16Ala-SOD2. Neste caso,

onde as células mononucleares do sangue periférico ligadas ao genótipo AA (AA-CMSPs) apresentaram níveis elevados em alguns marcadores oxidativos, incluindo o oxDNA (medido pela 8-oxodguO) e as células mononucleares do sangue periférico ligadas ao genótipo VV (VV-CMSPs) apresentaram níveis elevados de algumas moléculas inflamatórias em relação aos outros genótipos.

Antes dos resultados serem discutidos de maneira mais profunda, é importante destacarmos que apesar das limitações metodológicas associadas com os estudos *in vitro*, análises *in vivo* do gene e da influência dietética em drogas antipsicóticas representam um desafio, já que existem vários parâmetros que podem influenciar nos resultados e na interpretação de dados. Por este motivo, protocolos *in vitro* poderiam servir como abordagem exploratória para inferir a influência de variáveis genéticas e ambientais na resposta inflamatória desencadeada por antipsicóticos.

O protocolo do segundo estudo avaliou a influência do polimorfismo da SOD2 na resposta oxidativa e inflamatória da ZIP baseado em evidências prévias que sugerem a ocorrência de um desbalanço S-HP a nível basal determinado por ambos genótipos homozigóticos AA e VV. No polimorfismo da SOD2, uma mudança de aminoácido valina (GTT) por alanina (GCT) no codon 16 da enzima causa uma mudança protéica a nível estrutural afetando a proteína de transporte não ativa da SOD2 no interior da mitocôndria (SUTTON et al., 2003).

Assim sendo, esta modificação estrutural afeta a eficiência da SOD2, já que o alelo A produz uma proteína alfa hélice que ingressa facilmente na mitocôndria tornando-se uma enzima ativa e o alelo V produz uma proteína beta pregueada que é parcialmente reclusa na membrana mitocondrial. Nestas condições, investigações prévias estimaram que o genótipo AA produz uma atividade 40% superior da SOD2 em relação ao genótipo VV (SUTTON et al., 2003).

Embora o genótipo AA apresente maior atividade enzimática da SOD2, isso pode não ser benéfico uma vez que em tal genótipo ocorre a dismutação de concentrações elevadas de $O_2\bullet$ - em H_2O_2 , mas concomitantemente não ocorre a elevação nos níveis de GSH-Px, que subseqüentemente, catalizariam o H_2O_2 em água. O excesso de H_2O_2 basal poderia ser uma explicação chave para a associação entre o genótipo AA com o risco de desenvolvimento de vários tipos de câncer. Uma meta-análise recente que incluiu 33.098 casos e 37.831 controles de 88 estudos estimaram a associação entre o polimorfismo da SOD2 com este risco (WANG et al., 2018). Estudos prévios também descreveram que o genótipo AA poderia ser mais

sensível aos agentes pró-oxidantes ambientais como raios ultravioleta (UV) (MONTAGNER et al., 2010), metilmercúrio (ALGARVE et al., 2013), campos magnéticos estáticos moderados (DORNELLES et al., 2017) entre outros.

Neste estudo, foi observado inicialmente, uma drástica redução no número de células em cultura celular de 72 horas. Este resultado poderia indicar um forte efeito imunossupressor da ZIP em células AA ou um efeito notavelmente citotóxico. Nestas células foi observado níveis elevados de oxDNA, que é um marcador de dano ao DNA em relação às células ligadas ao genótipo VV. Outras moléculas pró-oxidantes também apresentaram altos níveis em AA-CMSPs assim como enzimas antioxidantes. Por outro lado, níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias foram encontrados em células ligadas ao genótipo AA indicando um estado inflamatório. Portanto, os resultados sugerem que a ZIP poderia apresentar um efeito cito-genotóxico em AA-CMSPs.

Nesta investigação, as VV-CMSPs apresentaram uma alta produção de marcadores inflamatórios em comparação as AA-CMSPs quando expostas à ZIP. O genótipo VV do polimorfismo Val16Ala-SOD2 está relacionado à baixa eficiência da enzima mantendo os níveis basais elevados de $O_2\bullet$ - nestas células. Apesar do $O_2\bullet$ - ser menos solúvel que o H_2O_2 na membrana, esta molécula apresenta alta afinidade pelo ON produzido virtualmente por todas as células do corpo. A reação entre o $O_2\bullet$ - e ON gera produtos potencialmente oxidativos em especial o peróxido nítrico que causa extensa peroxidação em moléculas lipídicas presentes na membrana celular e em outros compostos celulares (BRESCIANI et al., 2013).

De fato, macrófagos são células muito sensíveis sendo capazes de detectar e eliminar estruturas que contenham padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) endógenos e exógenos e padrões moleculares associados ao dano (DAMPs). Essas propriedades estão estritamente ligadas com a produção e regulação de moléculas oxidantes potencialmente prejudiciais e das citocinas. Por essa razão, os macrófagos são importantes produtores de ON, $O_2\bullet$ - e H_2O_2 (WEIGERT et al., 2018).

Contudo, essa produção é altamente controlada de acordo com o estado dos macrófagos e as condições microambientais. Portanto, elevados níveis basais de $O_2\bullet$ - poderiam representar uma maior sensibilidade aos macrófagos em desenvolverem uma determinada resposta inflamatória. Esse processo poderia explicar a potencial causa de associação entre o genótipo VV e o risco de desenvolvimento de várias

doenças metabólicas relacionadas à um estado crônico de inflamação de baixo grau (BRESCIANI et al., 2013 ; BRESCIANI et al., 2015). Entre essas podemos citar hipercolesterolemia (DUARTE et al., 2010), obesidade (MONTANO et al., 2009), doenças cardiovasculares incluindo angina pectoris (FUJIMOTO et al., 2010), derrame (FLORES et al., 2017) e complicações causadas pela diabetes tipo 2 incluindo retinopatia, nefropatia (MÖLLSTEN et al., 2009 ; TER CHAO et al., 2016) e alterações do perfil lipídico (POURVALI et al., 2016 ; HUANG et al., 2017).

Investigações complementares *in vitro* e *in vivo* mostraram que o genótipo VV está associado com um padrão inflamatório crônico incluindo altos níveis de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1 β , IL-6 e TNF α e baixos níveis de IL-10, uma citocina anti-inflamatória (MONTANO et al., 2012; BARBISAN et al., 2017). Além disso, outras investigações também tem descrito que o genótipo VV poderia ter alguma influência farmacogenômica em respostas pró ou anti-inflamatórias desenvolvidas por fármacos ou moléculas bioativas presentes em alimentos. Um estudo realizado por Duarte e colaboradores (2016) mostraram que pacientes hipercolesterolêmicos apresentam uma baixa eficiência da SOD2 (genótipo VV), exibindo assim uma atenuada resposta à rosuvastatina em comparação à pacientes do alelo A. O efeito da rosuvastatina em biomarcadores inflamatórios e fibrinolíticos foi menos intenso nos pacientes VV.

Barbisan e colaboradores (2018) também descreveram que os efeitos anti-inflamatórios *in vitro* do Li poderiam ser diretamente influenciados pelo polimorfismo Val16Ala-SOD2 que foi mais atenuado em VV-CMSPs do que em células ligadas ao alelo A. Os resultados descritos neste estudo corroboram o potencial efeito pró-inflamatório da ZIP em CMSPs similar aos estudos prévios realizados por Duarte e colaboradores (2018) em macrófagos RAW. Além disso, esse efeito tem algumas diferenças de acordo com genótipos homocigóticos desbalanceados : AA ou VV. Enquanto altos níveis basais de H₂O₂ parecem potencializar o efeito genotóxico e da ação de estresse oxidativo causado pela ZIP, em células com altos níveis basais de O₂^{•-}, ocorrem a potencialização de resposta inflamatória na proliferação de CMSPs e nos níveis de citocinas pró-inflamatórias.

Os resultados descritos neste segundo trabalho sugerem que ambos os genótipos do polimorfismo da SOD2 poderiam estar associados com efeitos negativos desenvolvidos pela administração da ZIP. É importante ressaltar que reações adversas em pacientes causaram mais do que 2 milhões de hospitalizações incluindo 100.000 mortes por ano nos Estados Unidos. Essas reações são associadas com

múltiplos fatores que incluem a variabilidade genética. Por esta razão, o conceito de farmacogenômica foi desenvolvido e consolidado com a finalidade de aumentar a eficácia e segurança de fármacos. Os efeitos negativos tem sido geralmente associados com a detoxificação dos genes do citocromo P450 (SHASTRY, 2006; TORNIO & BACKMAN, 2018). Contudo, os resultados descritos aqui também sugerem um potencial papel do desbalanço oxidativo desenvolvido por fatores genéticos na modulação de efeitos negativos de fármacos como a ZIP.

Apesar das restrições metodológicas, os resultados sugerem que o polimorfismo Val16Ala-SOD2 poderia apresentar alguma ação farmacogenômica nos efeitos adversos associados à ZIP relacionados ao metabolismo imune e oxidativo. Entretanto, se este efeito poderia ser encontrado em relação à outros antipsicóticos é uma questão em aberto que precisa ser elucidada em futuras investigações. Os resultados aqui descritos também indicaram que fatores externos como o consumo de alimentos ricos em moléculas bioativas, antioxidantes e anti-inflamatórias poderiam atenuar efeitos adversos no sistema imune relacionados com a exposição à ZIP.

A administração de fármacos antipsicóticos na qual inclui-se a ZIP, está diretamente relacionada ao desencadeamento de uma série de efeitos adversos aos quais estão relacionados com o processo oxidativo, inflamatório e genotóxico como evidenciado nos dois primeiros trabalhos deste estudo. Levando essas evidências em consideração, torna-se relevante avaliar a eficácia de suplementos ricos em moléculas bioativas que possam ser utilizados em associação ao tratamento farmacológico de pacientes psiquiátricos. O terceiro trabalho que compõe esta tese investigou o efeito da matriz química do guarana na modulação da resposta oxidativa-inflamatória desencadeada pela ZIP em macrófagos RAW.

Apesar da ZIP ser um antipsicótico com atenuados efeitos adversos metabólicos, um estudo prévio desenvolvido por Duarte e colaboradores (2018) mostrou que este medicamento poderia induzir alguma resposta inflamatória. Contudo, é possível que tal resposta causada pela ZIP possa ser modulada por moléculas bioativas presentes em bebidas energéticas incluindo entre elas, o guaraná. Os resultados descritos aqui corroboram esta hipótese, mostrando a inibição da proliferação celular de macrófagos ativados pela ZIP e a baixa atividade de citocinas pró-inflamatórias.

Antes de analisarmos os principais resultados, é importante ressaltar algumas propriedades farmacológicas da ZIP. Ela é um fármaco derivado do benzidoxazol com aprovação clínica devido sua ação efetiva em sintomas positivos e negativos da SCZ, sendo capaz de inibir a recaptação de serotonina e norepinefrina (MATTEI; RAPAGNANI & STAHL, 2011).

É relevante considerar que os macrófagos apresentam diferentes fenótipos de acordo com sua ontogenia e com o tecido em que elas estão localizadas. Portanto evidências tem mostrado que macrófagos maduros retém uma plasticidade notável em seu repertório de funções. Tal plasticidade é o fator principal da funcionalidade destas células já que contribuem diretamente e ativamente para restaurar a homeostase sob diferentes condições microambientais (WEIGERT et al., 2018). Nestes termos, é altamente provável que moléculas bioativas com propriedades anti-inflamatórias e antioxidativas poderiam atuar na ativação dos macrófagos.

Outro importante comentário a ser feito é a respeito das células RAW 264.7 usadas aqui como modelo experimental de agentes pró e anti inflamatórios. Esse modelo é originário da linhagem de células transformadas da leucemia de Abelson, a linhagem BALB/c derivada de camundongos. O uso de RAW em estudos experimentais *in vitro* é baseado em sua capacidade de realizar pinocitose e fagocitose.

Ao estimular o antígeno tipo lipopolissacarídeo (LPS), essas células aumentam a produção de ON, de outras citocinas inflamatórias e a proliferação celular. Um estudo recente realizado por Taciak e colaboradores (2018) sugeriu que as células RAW imitam macrófagos derivados da medula óssea em termos de receptores de superfície celular. No entanto o uso dessa linhagem comercial deve ser cauteloso, uma vez que suas características funcionais permanecem estáveis até a 30ª passagem. No presente estudo, os macrófagos RAW estiveram entre a décima oitava e vigésima quarta passagens de cultura celular. Uma investigação prévia também descreveu que o galato de epigallocatequina (EGCG) e outras CAQs possuem importante atividade inflamatória em macrófagos estimulados por LPS (ZHONG et al., 2012). Duarte e colaboradores (2018) descreveram que a ZIP foi capaz de induzir estado inflamatório similar à exposição à PHA.

As informações obtidas neste delineamento experimental mostram que polifenóis como as CAQs poderiam ser úteis em atenuar alterações pró-inflamatórias desencadeadas pela ZIP em macrófagos. Estes resultados sugerem o direto

envolvimento dos polifenóis e sua possível utilidade na modulação da saúde mental incluindo ações no comportamento, humor, plasticidade cerebral e cognição especialmente na SCZ, um distúrbio mental devastador onde ocorrem estados crônicos de neuroinflamação e estresse oxidativo. A interferência direta de polifenóis na patofisiologia da SCZ ainda não tem sido relatada. Contudo o aumento de estresse oxidativo causado por haloperidol foi inibido *ex vivo* por diferentes polifenóis. A curcumina, o extrato de chá verde e a *Ginkgo biloba*, podem apresentar benefícios em vários efeitos adversos associados com a administração de neurolépticos em pacientes portadores de SCZ. Os polifenóis na dieta possuem o potencial de tornarem-se medicamentos no campo da saúde mental após um minucioso estudo sobre os seus mecanismos de ação. O amplo uso de células RAW 264.7 incluem um número de estudos relativamente grande envolvendo o efeitos dos polifenóis presentes em vários extratos de plantas ou em alimentos. Esse é o caso de um trabalho desenvolvido por Palacz-Wrobel e colaboradores (2017) que investigaram os efeitos da apigenina, kaempferol e resveratrol na expressão gênica do TNF α , na secreção protéica e nos níveis de IL-10. Estas moléculas bioativas estão presentes em vários alimentos funcionais apresentando funções anti-inflamatórias e antioxidantes. Um estudo prévio conduzido por Kowalski e colegas (2005) demonstrou que todas as moléculas foram capazes de reduzir a intensidade do processo inflamatório por inibição de secreção desta citocina pró-inflamatória e por causar o aumento dos níveis de IL-10, uma citocina anti-inflamatória.

Portanto neste trabalho mostramos que CAQs totais isoladas ou um mix da matriz química do guarana poderiam atenuar a resposta inflamatória em macrófagos ativados pela ZIP corroborando investigações prévias.

Em relação às xantinas, tanto a CAF quanto a TEO parecem apresentar algum efeito anti-inflamatório. Estes resultados tem sido publicados na literatura, bem como um estudo subclínico realizado por Kempf e colaboradores (2010) onde bebedores habituais de café absteram-se de consumir a bebida por um mês, e após esse período consumiram pelo menos quatro copos de café filtrado por dia no segundo mês e no terceiro mês consumindo oito copos (150mL/copo). A análise dos marcadores bioquímicos sugerem que o consumo de café apresenta efeitos benéficos na inflamação subclínica por modular a expressão de citocinas inflamatórias e os níveis de HDL.

Contudo, há controvérsias em relação à CAF especialmente considerando a ingestão de bebidas ricas desta substância por pacientes com sintomas psicóticos. Efeitos biológicos ligados ao consumo de CAF são majoritariamente determinados por bloquear a ação exercida pela molécula em todos os receptores de adenosina localizados em neurônios e células da glia. Alguns estudos com animais descreveram que a CAF desenvolve um papel oposto à dopamina no ventrículo estriado (RIBEIRO & SEBASTIÃO, 2010) e que esta ação poderia ser explicada por estudos prévios que sugerem uma potencial associação entre SCZ e alto consumo de CAF, mas não com baixo e moderado (SCHIMPL et al., 2013).

Alguns estudos relatam que o consumo de CAF foi associado ao hábito de fumar que é altamente prevalente em pacientes esquizofrênicos, mas não à sintomatologia deste distúrbio psiquiátrico, incluindo psicose (GANDHI et al., 2010). Esse é o caso de um estudo realizado na Espanha para evidenciar ou não se após o controle de variáveis intervenientes, tais como o hábito de fumar Tabaco, uma associação entre a SCZ e a ingestão de café seria consistente. Os autores mostraram uma alta frequência de bebidas cafeinadas em pacientes com SCZ em relação ao grupo controle. Contudo, o hábito de fumar esteve diretamente associado com a CAF. Os autores consideraram que a falta de associação independente entre o consumo de CAF e a SCZ foi surpreendente. Baseado nestas controvérsias, bem como no efeito atenuante geral da resposta inflamatória em macrófagos encontrada nas três concentrações da matriz de xantina-catequina (XC) testada aqui, decidimos nos focar em análises subseqüentes na matriz com concentrações similares de CAF, TEO e CAQ.

Portanto é possível inferir que o papel da CAF em sintomas psicóticos é dependente de sua concentração molecular e talvez sua interação com outras moléculas bioativas presentes em determinada matriz de um alimento funcional. Essa posterior inferência continua sendo especulativa e deveria ser melhor investigada em estudos complementares. Entretanto, é relevante ressaltarmos neste presente estudo as propriedades gerais da TEO, outra das principais xantinas presentes na matriz química do guarana e também adicionada na matriz XC testada aqui.

Tem sido bem estabelecido que a CAF possui inúmeros efeitos benéficos que vão do aumento do estado de alerta até a redução do risco de doenças neurodegenerativas. Contudo, além da CAF outras xantinas menos estudadas do que esta substância como a TEO poderiam contribuir da mesma forma. Evidências

crescentes de estudos prévios sugerem que a TEO possui ações psicoativas em humanos que são qualitativamente diferentes em relação à CAF, como por exemplo o efeito na pressão sanguínea (MITCHELL et al., 2011 ; MARTÍNEZ-PINILLA; OÑATIBIA-ASTIBIA & FRANCO, 2015) Um estudo relatou menor prevalência de hipertensão em uma população idosa de ribeirinhos que habitualmente consumiam guaraná em relação a outras pessoas que nunca consumiram uma bebida contendo este fruto (KREWER et al., 2014).

Outro importante efeito fisiológico da TEO é a vasodilatação útil no tratamento da asma e de outros problemas respiratórios relacionados com níveis elevados de ON produzidos pela enzima óxido nítrico sintase (ONS1). Nesta investigação, a suplementação de TEO em macrófagos expostos à ZIP foram capazes de causar a reversão dos níveis de ON em concentrações similares encontradas no grupo controle. Esse efeito também foi encontrado em células suplementadas com CAQ enquanto que em células suplementadas com CAF, os níveis desse agente estressor foram parcialmente revertidos em comparação ao grupo controle tratado com ZIP. Devido às suas propriedades, há relatos de que o uso farmacológico de PENT, um análogo sintético da TEO apresenta efeitos atenuadores na inflamação e no estresse oxidativo associados ao dano agudo de pulmões expostos ao nitrogênio mostarda (SUNIL et al., 2014).

O efeito anti-inflamatório da PENT parece estar associado com a capacidade de inibir competitivamente a enzima fosfodiesterase em uma gama de células e tecidos aumentando o AMP cíclico (cAMP) intracelular, um segundo mensageiro que atua via proteína quinase A. Conseqüentemente, esta reação bioquímica suprime a transcrição dos genes de mediadores pró-inflamatórios incluindo TNF α . Além disso, evidências tem sugerido que o efeito inibitório da fosfodiesterase pela PENT poderia atuar diretamente em receptores tipo pedágio (TLR), uma molécula importante na resposta inflamatória. O estudo que descreveu este efeito sugeriu que a PENT poderia ser usada para prevenção clínica de condições como a sepse neonatal (SPEER et al., 2017).

Além disso, outros estudos relataram também que a TEO possui uma maior difusão no interior dos pulmões se comparada com outros fármacos usados na terapia de doenças respiratórias, sendo esse um aspecto diferencial em relação à CAF. Considerando os relatos de que a ZIP pode desencadear reações alérgicas e de hipersensibilidade bem como parada respiratória (GRESHAM & RUHA, 2010), é

possível inferir que suplementações mais ricas em TEO poderiam ser benéficas para enfraquecer esses sintomas negativos. É possível especular que a matriz XC que apresenta TEO em sua composição poderia atuar em importantes efeitos adversos desenvolvidos por outros antipsicóticos como a olanzapina por exemplo que trata-se de um ASG altamente relacionado ao diabetes através da indução de apoptose de células beta-pancreáticas. A PENT é considerada como um agente imunomodulador e anti-inflamatório utilizado para tratar distúrbios vasculares. Essa molécula inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias e conforme outros estudos experimentais, pode apresentar um efeito terapêutico contra a destruição auto-imune de células beta-pancreáticas induzidas por estreptozocina (MALEKIFARD et al., 2015).

Em conclusão, apesar das restrições metodológicas relacionadas à estudos *in vitro*, a totalidade dos resultados descritos aqui sugerem que a matriz XC inicialmente baseada no pó de guaraná poderia apresentar alguma ação benéfica nos efeitos pró-inflamatórios a nível periférico desencadeados pela ZIP. Estes resultados abriram a potencial perspectiva de um possível desenvolvimento de suprimentos ou outras formas farmacêuticas, incluindo adesivos transdérmicos para minimizar os efeitos oxidativos e pró-inflamatórios associados com a administração deste antipsicótico. É possível deduzir que esta ação poderia ser benéfica para atenuar outros efeitos adversos a nível metabólico induzido pelo uso de outros ASGs. Investigações *in vitro* e *in vivo* poderiam testar essa hipótese.

6 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados encontrados nos três trabalhos realizados que compõem este estudo, concluímos que:

- Os macrófagos expostos a diferentes concentrações de ZIP aumentaram a sua proliferação celular, os níveis de marcadores oxidativos, as citocinas pró inflamatórias e reduziram os níveis da citocina anti-inflamatória IL-10. A ZIP também demonstrou agir em nível genômico levando a super expressão dos genes de todas as citocinas investigadas, indicando ação pró-inflamatória deste antipsicótico.

- A ZIP apresentou uma possível ação pró-genotóxica, oxidativa e inflamatória em CMSPs vinculadas aos genótipos AA e VV, sugerindo assim que o polimorfismo Val16Ala-SOD2 poderia estar associado com efeitos adversos negativos causados por este medicamento.

- A matriz química do pó de guaraná que possui moléculas bioativas como PENT, TEO, CAF e outras CAQs podem atenuar o efeito pró-inflamatório e oxidativo em macrófagos expostos a ZIP.

Em resumo, o conjunto dos resultados encontrados nesta tese, apesar das limitações metodológicas, mostram a possível influência do polimorfismo da SOD2 em efeitos adversos desencadeados pela ZIP e que moléculas bioativas presentes na XC-Mix do guaraná podem garantir efeitos anti-inflamatórios e antioxidativos. Estes resultados podem ser relevantes na clínica psiquiátrica ao mesmo tempo em que estimula novas pesquisas para o desenvolvimento de métodos alternativos para o tratamento de distúrbios metabólicos associados à terapia antipsicótica.

7 REFERÊNCIAS

ABBAS, A.; LICHTMAN, A.H; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 8º ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

AGUIAR, C.C.T. et al. Esquizofrenia: uma doença inflamatória? **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**, v.59, n.1, p.52 – 57, 2010.

AKKAYA, C. et al. Urticaria and angio-oedema due to ziprasidone. **Journal of Psychopharmacology**, v.21, n.5, p.550-552, 2007.

ALGARVE, T. D. et al. In vitro effects of Ala16Val manganese superoxide dismutase gene polymorphism on human white blood cells exposed to methylmercury. **Genetics and Molecular Research**. v.12, n.4, p.5134–5144, 2013.

ALI, F. T. Redox dysregulation, immuno-inflammatory alterations and genetic variants of BDNF and MMP-9 in schizophrenia: Pathophysiological and phenotypic implications. **Schizophrenia Research** [Epub ahead of print] 2017.

ALKHALIDY, H., WANG, Y., LIU, D. Dietary flavonoids in the prevention of T2D: an overview. **Nutrients**, v.10, n.4, p.1-33, 2018.

ALMARIO, B. et al. Pentoxifylline and prevention of hyperoxia-induced lung -injury in neonatal rats. *Pediatric Research*. v.71, n.5, p.583–589, 2012.

ANDORKO, N.D. et al. The association between sleep dysfunction and psychosis-like experiences among college students. **Psychiatry Research**, v.248, n.1, p.6 – 12, 2017.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos: uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v.6, n.1, p.1-9, 2007.

ANSEN-WILSON, L.J.; LIPINSKI, R.J. Gene-environment interactions in cortical interneuron development and dysfunction: A review of preclinical studies. **Neurotoxicology**, v.5, n.58, p.120-129, 2016.

ARRUDA, M. O. V. et al. S. M. M. Activities of the antipsychotic drugs haloperidol and risperidone on behavioural effects induced by ketamine in mice. **Scientia Pharmaceutica**, v. 76, n.1, p. 673- 687, 2008.

ASSELIN, C. et al. Circulating levels of linoleic acid and HDL-cholesterol are major determinants of 4-hydroxynonenal protein adducts in patients with heart failure. **Redox Biology**, v.2, n.1, p.148-155, 2014.

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

ASHRAF, S. et al. A Case of Ziprasidone-Induced Hypersensitivity Pneumonitis: A Previously Unreported Side Effect of an Atypical Antipsychotic. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. 2018.

AZZOLIN, V. F. et al. Superoxide-hydrogen peroxide imbalance interferes with colorectal cancer cells viability, proliferation and oxaliplatin response. **Toxicology in Vitro**, v.32, n.1, p.8-15, 2016.

BAKKER, G. C. et al. An antiinflammatory dietary mix modulates inflammation and oxidative and metabolic stress in overweight men: A nutrigenomics approach. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.91, n.4, p.1044-1059, 2010.

BALŮTŠEV, R. et al. Inflammatory, cardio-metabolic and diabetic profiling of chronic schizophrenia. **European Psychiatry**, v.39, n.1, p.1-10, 2017.

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, 2014, e107299.

BARBISAN, F. The In Vitro Influence of a Genetic Superoxide-Hydrogen Peroxide Imbalance on Immunosenescence. **Rejuvenation Research**. v.20, n.4, p.334–345, 2017.

BARBISAN, F. et al. Xanthine-catechin mixture enhances lithium-induced-anti-inflammatory response in activated macrophages in vitro. **BioMed Research International**, v.2017, n.1, p.1-10, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/4151594>

BARBISAN, F. et al. Genetic or pharmacological superoxide-hydrogen peroxide imbalances modulate the in vitro effects of lithium on glycogen synthase kinase-3 β . **Gene**. v.655, n.1, p.48–55, 2018.

BEUREL, E.; JOPE, R. S. Inflammation and lithium: clues to mechanisms contributing to suicide-linked traits. **Translational Psychiatry**, v.4, n.12, e488, 2014.

BIAN, Q. et al. The effect of typical antipsychotics, perospiridone, ziprasidone and quetiapine on microglial activation induced by interferon-gamma. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v.32, n.1, p.42-48, 2008.

BITANIHIRWE, B.K.Y.; WOO, T.W. Oxidative stress in schizophrenia: An integrated approach. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 35, n. 3, p. 878-893, 2011.

BITTENCOURT, L. S. et al. The protective effects of guaraná extract (*Paullinia cupana*) on fibroblast NIH-3T3 cells exposed to sodium nitroprusside. **Food and Chemical Toxicology**, v.53, n.1, p.119-125, 2013.

BOŠKOVIĆ, M. et al. Oxidative Stress in Schizophrenia. **Current Neuropharmacology**, v.9, n.2, p.301 – 312, 2011.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência à Saúde. Departamento de Ações Programáticas estratégicas. IV conferência Nacional de saúde Mental-Intersetorial: Relatório Final. Brasília Ministério da Saúde. 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. **Cadernos de Atenção Básica, nº 34**: Saúde Mental. Brasília: Editora MS, 2013. 176 p.

BRESCIANI, G. et al. The MnSOD Ala16Val SNP: relevance to human diseases and interaction with environmental factors. **Free Radical Research**, v.47, n.1, p.781-792, 2013.

BRESCIANI, G; da CRUZ, I. B., GONZÁLEZ-GALLEGO, J. Manganese superoxide dismutase and oxidative stress modulation. **Advances in Clinical Chemistry**, v.68, n.1, p.87-130, 2015.

BRESEE, L. C. et al. Diabetes, cardiovascular disease, and health care use in people with and without schizophrenia. **European Psychiatry**, v.26, n.5, p.327-332, 2011.

BRESSAN, R. A., COSTA, D. C., JONES, H. M., ELL, P. J., PILOWSKY, L.S. Typical antipsychotic drugs -- D(2) receptor occupancy and depressive symptoms in schizophrenia. **Schizophrenia Research**, v.56, n.1-2, p.31-36, 2002.

BROWN, A.S. The environment and susceptibility to schizophrenia. **Progress in neurobiology**, v.93, n.1, p. 23 – 58, 2011.

BROWN, S. et al. Twenty-five year mortality of a community cohort with schizophrenia. **The British Journal of Psychiatry**. v.196, n.2, p.116–21, 2010.

BRUNO, A. et al. Bergamot polyphenolic fraction supplementation improves cognitive functioning in schizophrenia: data from an 8-week, open-label pilot study. **Journal of Clinical Psychopharmacology**, v.37, n.4, p.468-471, 2017.

BYRNE, M. et al. Obstetric conditions and risk of first admission with schizophrenia: a Danish national register based study. **Schizophrenia Research**, v.1, n.3, p.51 – 59, 2007.

CALABRESE, V. et al. Hormesis, cellular stress response and neuroinflammation in schizophrenia: Early onset versus late onset state. **Journal of Neuroscience Research**, v., n.5, p.1182-1193, 2017.

CAPELETO, D. et al. The anti-inflammatory effects of resveratrol on human peripheral blood mononuclear cells are influenced by a superoxide dismutase 2 gene polymorphism. **Biogerontology**, v.16, n.5, p.621-630, 2015.

CASTRO, A. P., ELKIS, H. Rehospitalization rates of patients with schizophrenia discharged on haloperidol, risperidone or clozapine. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v.29, n.3, p.207-212, 2007.

CATALGOL, B. K.; OZDEN, S.; ALPERTUNGA, B. Effects of trichlorfon on malondialdehyde and antioxidant system in human erythrocytes. **Toxicology In Vitro**, v.21, n.1, p.1538-1544, 2007.

CHAO, M.V. Neurotrophin signalling in health and disease. **Clinical Science (London)**, v.110, n.1, p.167–173, 2006.

CHASE, K. A. et al. Metabolic and inflammatory genes in schizophrenia. **Psychiatry Research**, v.225, n.1-2, p.208-211, 2015.

CHEN, J. et al. 2017. Molecular mechanisms of antipsychotic drug-induced diabetes. **Frontiers in Neuroscience**. v.11, n.1, p.1-12, 2017.

CHEN, X., MU, K., KITTS, D. D. Characterization of phytochemical mixtures with inflammatory modulation potential from coffee leaves processed by green and black tea processing methods. **Food Chemistry** [Epub ahead of print.], 2018.

CHENG, Y. C. et al. Polyphenols and oxidative stress in atherosclerosis-related ischemic heart disease and stroke. **Oxidative Medicine and Cell Longevity**, v.2017, n.1, p.1-16, 2017.

Chinese Medical Association Diabetes Society. **[Prevention Guide of Chinese Type 2 Diabetes (2010 edition)]**. Beijing: Peking University Medical Press. 2011; p: 1-36. Chinese

CHITTIPROL, S. et al. Oxidative stress and neopterin abnormalities in schizophrenia: A longitudinal study. **Journal Psychiatry Research**, v. 44, n. 5, p.310-313, 2009.

CITROME, L. et al. Weight gain and changes in metabolic variables following olanzapine treatment in schizophrenia and bipolar disorder. **Clinical Drug Investigation**, v.31, n.7, p.455–482, 2011.

CORDIOLI, A. V.; GALLOIS, C. B.; ISOLAN, L. (Org.). **Psicofármacos: consulta rápida**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2015.

COROMINAS-ROSO, M. et al. IL-6 and TNF- α in unmedicated adults with ADHD: Relationship to cortisol awakening response. **Psychoneuroendocrinology**, v.79, n.1, p. 67 – 73, 2017.

COUTINHO, E.; VINCENT, A. Autoimmunity in neuropsychiatric disorders. **Handbook Clinical Neurology**, v.133, n.1, p.269 – 282, 2016.

DALGALARRONDO, P. **Psicopatologia e semiologia dos transtornos mentais**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008. p.440

DARWISH, M. et al. Evaluation of the potential for a pharmacokinetic drug-drug interaction between armodafinil and ziprasidone in healthy adults. **Clinical Drug Investigation**, v.34, n.10, p.691-699, 2014.

DEVERMAN, B.E.; PATTERSON, P.H. Cytokines and CNS development. **Neuron**, v.64, n.1, p.61 – 78, 2009.

DIAS, G. P. et al. The role of dietary polyphenols on adult hippocampal neurogenesis: molecular mechanisms and behavioural effects on depression and anxiety. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v.12, Article ID 541971, p.1-18, 2012.

DI MINNO, A. et al. 8-Hydroxy-2-deoxyguanosine levels and heart failure: A systematic review and meta-analysis of the literature. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v.27, n. 3, p.201 – 208, 2017.

DIETRICH-MUSZALSKA, A.; KOPKA, J.; KWIATKOWSKA, A. The effects of ziprasidone, clozapine and haloperidol on lipid peroxidation in human plasma (*in vitro*): comparison. **Neurochemical Research**, v.38, n.7, p.1490-1495, 2013.

DIETRICH-MUSZALSKA, A; KOPKA, J.; KONTEK, B. Polyphenols from Berries of *Aronia melanocarpa* reduce the plasma lipid peroxidation induced by ziprasidone. **Schizophrenia Research Treatment**. doi: 10.1155/2014/602390, 2014.

DO, K.Q. et al. Redox dysregulation, neurodevelopment, and schizophrenia. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 19, n. 2, p. 220–230, 2009.

DONNE, I. D. Biomarkers of Oxidative Damage in Human Disease. **Clinical Chemistry**, v.52, n.4, p. 601 – 623, 2006.

DORNELLES, E. B. et al. Cytotoxic effects of moderate static magnetic field exposure on human periphery blood mononuclear cells are influenced by Val16Ala-MnSOD gene polymorphism. **Environmental Science and Pollution Research International**. v.24, n.5, p.5078–5088, 2017.

DREXHAGE, R.C. et al. The mononuclear phagocyte system and its cytokine inflammatory networks in schizophrenia and bipolar disorder. **Expert Review of Neurotherapeutics**, v.10, n.1, p.59 – 76, 2010.

DSM - V. **Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais V. 5 ed.** Porto Alegre: Artmed, 2014.

DUARTE, M. M. M. F. et al. Oxidative stress in hypercholesterolemia and its association with Ala16Val superoxide dismutase gene polymorphism. **Clinical Biochemistry**, v. 43, p. 1118-1123, 2010.

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. Ziprasidone, a second-generation antipsychotic drug, triggers a macrophage inflammatory response *in vitro*. **Cytokine**. v.106, n.1, p.101–107, 2018.

DUMAN, R. S. et al. Malberg J, Nakagawa S, D'as C. Neuronal plasticity and survival in mood disorders. **Biological Psychiatry**, v.48, n.8, p.732-739, 2000.

EGGERS, A. E. Extending David Horrobin's membrane phospholipid theory of schizophrenia: overactivity of cytosolic phospholipase A (2) in the brain is caused by overdrive of coupled serotonergic 5HT (2A/2C) receptors in response to stress. **Medical Hypotheses**, v.79, n.6, p.740-743, 2012.

ELKIS, H. et al. Brazilian Consensus on second-generation antipsychotics and metabolic disorders. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v.30, n.1p.77-85, 2008.

ELMAN, I.; BORSOOK, D.; LUKAS, S.E. Food intake and reward mechanisms in patients with schizophrenia: implications for metabolic disturbances and treatment with second-generation antipsychotic agents. **Neuropsychopharmacology**, v.31, n.10, p.2091–2120, 2006.

ERSHOVA, E. S. et al. Quantification of cell-free DNA in blood plasma and DNA damage degree in lymphocytes to evaluate dysregulation of apoptosis in schizophrenia patients. **Journal of Psychiatric Research**. v.87, p.15–22, 2017.

FANG, S. H. et al. Associations between sleep quality and inflammatory markers in patients with schizophrenia, **Psychiatry Research**, v.246, n.1, p.154-160, 2016.

FARGALI S, et al. Role of neurotrophins in the development and function of neural circuits that regulate energy homeostasis. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 48, n.3, p.654–659, 2012.

FENDRI, C. et al. Implication du stress oxydant dans la physiopathologie de la schizophrénie: revue de la littérature. **L'encéphale**, v. 32, n. 2, p.244-252, 2006.

FERNANDO, W. M. A. D. B. et al. Diabetes and Alzheimer's Disease: Can Tea Phytochemicals Play a Role in Prevention?. **Journal of Alzheimer's Disease**, v.59, n.2, p.481-581, 2017.

FILHO E. A. C. et al. Dislipidemias e antipsicóticos atípicos. **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**, v.55, n.4, p.296-307, 2006.

FIRTH, J. et al. The pro-cognitive mechanisms of physical exercise in people with schizophrenia. **British Journal of Pharmacology**, 2017 [Epub ahead of print].

FLATOW, J.; BUCKLEY, P.; MILLER, B.J. Meta-Analysis of Oxidative Stress in **Schizophrenia Biological Psychiatry**, v.74, n.6, p.400 – 409, 2013.

FLORES, A. E. et al. ALA16VAL-MnSOD gene polymorphism and stroke: Association with dyslipidemia and glucose levels. **Gene**. v.627, n.1, p.57–62, 2017.

FORNARO, M. et al. Prevalence and clinical features associated with bipolar disorder polypharmacy: a systematic review. **Journal of Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v.12, n., p.719-735, 2016.

FRAGUAS, D. et al. Oxidative Stress and Inflammation in Early Onset First Episode Psychosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. **The International Journal of Neuropsychopharmacology**. v.20, n.6, p.435–444, 2017.

FREY, B. N. et al. Effects of mood stabilizers on hippocampus BDNF levels in an animal model of mania. **Life Sciences**, v.79, n.3, p.281-286, 2006.

FRYDECKA, D. et al. Interleukin-6: the missing element of the neurocognitive deterioration in schizophrenia? The focus on genetic underpinnings, cognitive impairment and clinical manifestation. **European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience**, v.265, n.6, p.449 – 459, 2015.

FUENTES, D. et al. **Neuropsicologia: teoria e prática**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 432p.

FUJIMOTO, H. et al. Association of the manganese superoxide dismutase polymorphism with vasospastic angina pectoris, **Journal of Cardiology**. v.55, n.2, p.205–210, 2010.

FUKUMOTO, T. et al. Chronic lithium treatment increases the expression of brain-derived neurotrophic factor in the rat brain. **Psychopharmacology**, v.158, n.1, p.100-106, 2001.

GABBARD, G. O. **Psiquiatria psicodinâmica na prática clínica**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.

GALLING, B. et al. Antipsychotic augmentation vs. monotherapy in schizophrenia: systematic review, meta-analysis and meta-regression analysis. **World Psychiatry**, v.16, n.1, p.77-89, 2017.

GANDHI, K. K. et al. Higher serum caffeine in smokers with schizophrenia compared to smoking controls. **Drug and Alcohol Dependence**. v.110, n.1-2, p.151–155, 2010.

GARCIA-RIZO, C. Metabolic syndrome or glucose challenge in first episode of psychosis? **European Psychiatry**, 2016 [Epub ahead of print].

GARETH, T. **Química Medicinal: uma introdução**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

GIEGLING, I. et al. Genetics of schizophrenia: A consensus paper of the FSBP Task Force on Genetics. **The World Journal of Biological Psychiatry**, 2017 [Epub ahead of print].

GODFREY, R.; JULIEN, M. Urbanisation and health. **Clinical Medicine**, v.5, n.2, p.137–141, 2005.

GRESHAM, C.; RUHA, A. M. Respiratory failure following isolated ziprasidone ingestion in a toddler. **Journal of Medical Toxicology**. v.6, n.1, p.41-43, 2010.

GRIESINGER, C. et al. Validation of Alternative *In Vitro* Methods to Animal Testing: Concepts, Challenges, Processes and Tools. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.132, n.1, p.856-865, 2016.

GOETZ, M. E.; LUCH, A. Reactive species: a cell damaging route assisting to chemical carcinogens. **Cancer Letters**, v. 266, n. 1, p. 73-83, 2008.

GOLUBEVA, A.V. et al. Metabotropic Glutamate Receptors in Central Nervous System Diseases. **Current Drug Target**, v.17, n.5, p.538 – 616, 2016.

GONCALVES, D. A. et al. Brazilian multicentre study of common mental disorders in primary care: rates and related social and demographic factors. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 30, n. 3, p. 623-632, 2014.

GOSSAGE-WORRALL, R. et al. STEPWISE – Structured lifestyle Education for People with Schizophrenia: a study protocol for a randomised controlled trial. **Trials**, v.17, p.475, 2016.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. 13 ed. São Paulo: Elsevier, 2017.

HALLIWELL, B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. **Drugs Aging**, v.18, n.9, p.685–716, 2001.

HAMAZAKI, K.; HAMAZAKI, T.; INADERA, H. Abnormalities in the fatty acid composition of the postmortem entorhinal cortex of patients with schizophrenia, bipolar disorder, and major depressive disorder. **Psychiatry Research**, v.210, n.1, p.346-350, 2013.

HAMDANI, N. et al. Effects of Cumulative Herpesviridae and Toxoplasma gondii Infections on Cognitive Function in Healthy, Bipolar, and Schizophrenia Subjects. **Journal of Clinical Psychiatry**, v.78, n.1, p. e18 – e27, 2017.

HAMERA, L.; KHISHFE, B. F. Kounis syndrome and ziprasidone. **The American Journal of Emergency Medicine**, v.35, n.3, 493-494, 2017. doi: 10.1016/j.ajem.2016.11.061.

HAN, D-W. et al. Effects of green tea polyphenol on preservation of human saphenous vein. **Journal of Biotechnology**, v.110, n.1, p.109-117, 2004.

HARDINGHAM, G. E.; DO, K. Q. Linking early-life NMDAR hypofunction and oxidative stress in schizophrenia pathogenesis. **Nature Reviews Neuroscience**, v.17, n.2, p.125-134, 2016.

HENDERSON, D. C. et al. Clozapine, diabetes mellitus, hyperlipidemia and cardiovascular risks and mortality: results of a 10-year naturalistic study. **Journal of Clinical Psychiatry**, v.66, n.9, p.1116-21, 2005.

HIGGINS, E. S.; GEORGE, M. **Neurociências para Psiquiatria Clínica: Fisiologia do Comportamento e da Doença Mental**. 1 ed. Rio de Janeiro: Artmed, 2010.

HIGGINS, J.P. et al. Energy Drinks: A Contemporary Issues Paper. **Currents Sports Medicine Report**. v.17, n.2, p.65-72, 2018.

HILAL-DANDAN, R.; BRUNTON, L. L. **Manual de farmacologia e terapêutica de Goodman & Gilman**. 2. ed. Porto Alegre: AMGH, 2015. 1216 p.

HILLEKE, E.; HULSHOFF, P.; KAHN, R.S. What happens after the first episode? A review of progressive brain changes in chronically ill patients with schizophrenia. **Schizophrenia Bulletin**, v.34, n.1, p.354 – 366, 2009.

HITZEROTH, A. et al. Association between the MnSOD Ala-9Val polymorphism and development of schizophrenia and abnormal involuntary movements in the Xhosa population. **Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry**, v.31, p.664-672, 2007.

HJORTH, P. et al. A systematic review of controlled interventions to reduce overweight and obesity in people with schizophrenia. **Acta Psychiatrica Scandinavica**, v.130, n., p.279-289, 2014.

HOLKA-POKORSKA, J. A. et al. [The stabilizing effect of dehydroepiandrosterone on clinical parameters of metabolic syndrome in patients with schizophrenia treated with olanzapine – a randomized, double blind trial]. **Psychiatria Polska**, v.49, n.2, p.363-376, 2015.

HOLT, R.; MITCHELL A. J. Diabetes mellitus and severe mental illness: mechanisms and clinical implications. **Nature Reviews Endocrinology**, v.11, n.2, p.79–89, 2015.

HOLT, R.; PEVELER, R. C. Obesity, serious mental illness and antipsychotic drugs. **Diabetes Obesity Metabolism**, v.11, n.7, p.665–79, 2009.

HOPE, S. et al. Inflammatory markers are associated with general cognitive abilities in schizophrenia and bipolar disorder patients and healthy controls. **Schizophrenia Research**, v.165, n.2-3, p.188-194, 2015.

HORI, H. et al. Manganese superoxide dismutase gene polymorphism and schizophrenia: relation to tardive dyskinesia, **Neuropsychopharmacology**, v.23, n.2, p.170-177, 2000.

HUANG, T.; LIOU, C.; LIN, T. Serum thiobarbituric acid-reactive substances and free thiol levels in schizophrenia patients: Effects of antipsychotic drugs **Psychiatry Research**, v. 177, n. 1-2, p. 18-21, 2010.

HUANG, L. et al. MnSOD Val16Ala polymorphism associated with retinopathy risk in diabetes: a PRISMA-compliant Meta-analysis of case-control studies. **International Journal of Ophthalmology**. v.10, n.4, p.639-645, 2017.

JAYARATHNE, S. et al. Anti-inflammatory and anti-obesity properties of food bioactive components: effects on adipose tissue. **Preventive Nutrition and Food Science**, v.22, n.4, p.251-262, 2017.

JENTZSCH, A. M. et al. Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. **Free Radical Biology & Medicine**. v.20, n.2, p.251-256, 1996.

JIANG, Z.; ZHU, L. Update on the role of alternatively activated macrophages in asthma. **Asthma Allergy**, v.9, n.1, p.101-107, 2016.

JUNG, I. E. C. et al. Haloperidol and risperidone at high concentrations activate *in vitro* inflammatory response of RAW 264.7 macrophage cells by induction of apoptosis and modification of cytokine levels. **Psychopharmacology**, v.233, n.1, p.1715-1723, 2016.

KAHN, R. S. et al. Effectiveness of antipsychotic drugs in first-episode schizophrenia and schizophreniform disorder: an open randomised clinical trial. **Lancet**, v.371, n.9618, p.1085–97, 2008.

KAPELSKI, P. et al. An Association Between Functional Polymorphisms of the Interleukin 1 Gene Complex and Schizophrenia Using Transmission Disequilibrium Test. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis** [Epub ahead of print] 2017.

KAPLAN, H.I.; SADOCK, B.J. **Manual conciso de psiquiatria clínica**. 2 ed. Porto Alegre: Artmed; 2008.

KARAPIDAKI, I. et al. Cytogenetic effects of valproic acid and ziprasidone in human lymphocyte cultures. **Neuropsychobiology**, v.64, n.4, p.219-223, 2011.

KATZUNG, B. G.; TREVOR, A. **Farmacologia básica e clínica**. 13 ed. São Paulo: Lange, 2017.

KEFELIOĞLU, H. Ziprasidone induces cytotoxicity and genotoxicity in human peripheral lymphocytes. **Drug and Chemical Toxicology** v.40, n.4, p.425-437, 2017.

KHOURY, R.; NASRALLAH, H. A. Inflammatory biomarkers in individuals at clinical high risk for psychosis (CHR-P): State or trait? **Schizophrenia Research**. v.199, n.1, p.31-38, 2017.

KIM, D. et al. Comparative study on modeccin- and phytohemagglutinin (PHA)-induced secretion of cytokines and nitric oxide (NO) in RAW 264.7 cells. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v.43, n.1, p.52-60, 2011.

KIM, M. S. et al. Ziprasidone-induced hypersensitivity syndrome confirmed by reintroduction. **International Journal of Dermatology**, v.53, n.4, e: 267-8, 2014.

KINON, B.J. et al. Association between early and rapid weight gain and change in weight over one year of olanzapine therapy in patients with schizophrenia and related disorders. **Journal of Clinical Psychopharmacology**, v.25, n.3, p.255–258, 2005.

KEMPF, K. et al. Effects of coffee consumption on subclinical inflammation and other risk factors for type 2 diabetes: a clinical trial. **The American Journal Of Clinical Nutrition**. v.91, n.4, p.950-957, 2010.

KOGA, M. et al. Implications for reactive oxygen species in schizophrenia pathogenesis. **Schizophrenia Research**, v. 176, n. 1, p. 52–71, 2015.

KOLAHDOUZAN, M; HAMADEH, M. J. The neuroprotective effects of caffeine in neurodegenerative diseases. **CNS Neuroscience & Therapeutics**, v.23, n.4, p.272-290.

KONTOANGELOS, K. et al. Homocysteine, Cortisol, Diabetes Mellitus, and Psychopathology. **Journal of Diabetes Research**, v.1, n.1, p.1 – 10, 2015.

KOOLA, M.M. Cytokines in Schizophrenia: Hope or Hype? **Indian Journal of Psychological Medicine**, v.38, n.2, p.97 – 100, 2016.

KOPPEL I, et al. Tissue-specific and neural activity-regulated expression of human BDNF gene in BAC transgenic mice. **Biomedical Neuroscience**, v.10, n.60, p. 1-14, 2009.

KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER, J. H. **Química farmacêutica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

KOSTER, L. S., CARBON, M., CORRELL, C.U. Emerging drugs for schizophrenia: an update. **Expert Opinion on Emerging Drugs**, v.19, n.4, p.511-531, 2014.

KREWER C. C. et al. Habitual intake of guaraná and metabolic morbidities: an epidemiological study of an elderly amazonian population. **Phytotherapy Research**, v.25, n.9, p.1367-1374, 2011.

KREWER, C. C. et al. Guaraná, a supplement rich in caffeine and catechin, modulates cytokines: evidence from human in vitro and in vivo protocols. **European Food Research and Technology**, v.239, n.1, p.49-57, 2014.

KU, H. L. et al. Ziprasidone-associated pedal edema in the treatment of schizophrenia. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v.30, n.5 p.963-964, 2006.

LANCTÔT, K.L. et al. Neuropsychiatric signs and symptoms of Alzheimer's disease: New treatment paradigms. **Alzheimer's & Dementia**. v.3, n.3, p.440–449, 2017.

LEE, J. S. et al. Prevalence of Metabolic Syndrome in Patients with Schizophrenia in Korea: A Multicenter Nationwide Cross-Sectional Study. **Psychiatry Investigation**, v.14, n.1, p.44-50, 2017.

LESEM, M. D. Intramuscular ziprasidone, 2 mg versus 10 mg, in the short-term management of agitated psychotic patients. **Journal of Clinical Psychiatry**, v.62, n.1, p.12-18, 2001.

LEVINE, R. L. et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymology**. v.186, n.1, p.464-478, 1990.

LEY, K. et al. How Mouse Macrophages Sense What Is Going On. **Frontiers in Immunology**, v.7, n.1, p.1-17, 2016.

LI, J. et al. Increased serum brain-derived neurotrophic factor levels following electroconvulsive therapy or antipsychotic treatment in patients with schizophrenia, **European Psychiatry**, 2016 [Epub ahead of print].

LIEBERMAN, J. A.; STROUP, T. S.; PERKINS, D. O. **Fundamentos da esquizofrenia**. Porto Alegre: Artmed, 2012. 286p.

LIM, S.Y. et al. Nutritional Factors Affecting Mental Health. **Clinical Nutrition Research**, v.5, n.3, p. 143 - 152, 2016.

LIN, C.; LANE, H.; TSAI, G. E. Glutamate signaling in the pathophysiology and therapy of schizophrenia. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, n.4, v.1, p.1-9, 2011.

LISTER, J. F. et al. Drug-Induced Systemic Hypersensitivity Reaction Associated With Ziprasidone: An Atypical Occurrence. **Journal of Clinical Psychopharmacology**, v.35, n.4, p.478-480, 2015.

LIU, H. et al. Association of the manganese superoxide dismutase gene Ala-9Val polymorphism with clinical phenotypes and tardive dyskinesia in schizophrenic patients. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v.34, n.4, p.692-696, 2010.

LÜLLMANN, H.; MOHR, K.; HEIN, L. **Farmacologia: texto e atlas**. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

MACHADO, A. K. et al. Guarana (*Paullinia cupana*) improves the proliferation and oxidative metabolism of senescent adipocyte stem cells derived from human lipoaspirates. **Food Research International**, v.67, n.1, p.426-433, 2015.

MAGALHÃES, P.V. et al. Antioxidant treatments for schizophrenia. **The Cochrane Database of Systematic Reviews**, v.2, n.CD008919, p.1 – 39, 2016.

MAHADEVAN, J. et al. An exploratory study of immune markers in acute and transient psychosis **Asian Journal of Psychiatry**, v. 25, n.1, p.219 – 223, 2017.

MALEKIFARD, F. et al. Immunotherapeutic effects of pentoxifylline in type 1 diabetic mice and its role in the response of T-helper lymphocytes. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**. v.18, n.13, p.247-252, 2015.

MARNETT, L.; PLASTARAS, J.P. Endogenous DNA damage and mutation. **Trends in Genetics**, v. 17, n.4, p.215-221, 2001.

MARTÍNEZ-PINILLA, E.; OÑATIBIA-ASTIBIA, A.; FRANCO, R. The relevance of theobromine for the beneficial effects of cocoa consumption. **Frontiers in Pharmacology**. v.6, n.30, p.1-5, 2015. doi: 10.3389/fphar.2015.00030

MATTEI, C.; RAPAGNANI, M. P.; STAHL, S. M. Ziprasidone hydrochloride: what role in the management of schizophrenia? **Journal of central nervous system disease**. v.3, n.1, p.1-16, 2011.

MAURI, M.C. et al. Clinical Pharmacokinetics of Atypical Antipsychotics: An Update. **Clinical Pharmacokinetics**. v.57, 12, p.1493-1528, 2018. doi:10.1007/s40262-018-0664-3.

MCCREADIE, R. et al. Dietary intake of schizophrenic patients in Nithsdale, Scotland: case-control study. **BMJ**, v.317, n.7161, p.784–785, 1998.

McEWEN, B. S.; STELLAR, E. Stress and the individual: mechanisms leading to disease. **Archives of Internal Medicine**, v.153, n.18, p.2093-2101, 1993.

MCGRATH, J. et al. Schizophrenia: a concise overview of incidence, prevalence, and mortality. **Epidemiologic Reviews**, v.30, n.1, p.67–76, 2008.

MEEUSEN, R. Exercise, nutrition and the brain. **Sports Medicine**, v.44, n.1, p.47-56, 2014.

MELTZER, H. Y. et al. A randomized trial comparing clozapine and typical neuroleptic drugs in non-treatment-resistant schizophrenia. **Psychiatry Research**, v.177, n.3, p.286-293, 2010.

MEYER, U.; FELDON, J.; YEE, B.K. A review of the fetal brain cytokine imbalance hypothesis of schizophrenia. **Schizophrenia Bulletin**, v.35, n.5, p.959 – 972, 2009.

MIAO, Z.; KAMEL, A.; PRAKASH, C. Characterization of a novel metabolite intermediate of ziprasidone in hepatic cytosolic fractions of rat, dog, and human by ESI-MS/MS, hydrogen/deuterium exchange, and chemical derivatization. **Drug Metabolism & Disposition**, v.33, n.7, p.879-883, 2005.

MICHEL, T. M. Cu, Zn- and Mn-superoxide dismutase levels in brains of patients with schizophrenia psychosis. **Journal of Neural Transmission**, v.111, n.9, p.1191-1201, 2004.

MICÓ J.A. et al. Reduced antioxidant defense in early onset first-episode psychosis: a case- control study. **BMC Psychiatry**, v.11, n.26, p. 1 – 8, 2011.

MISHARA AL, GOLDBERG TE. A meta-analysis and critical review of the effects of conventional neuroleptic treatment on cognition in schizophrenia: opening a closed book. **Biological Psychiatry**, v.55, n.10, p.1013-1022, 2004.

MISTNEFES, M. et al. Ceramides and cardiac function in children with chronic kidney disease. **Pediatric Nephrology**, v.29, n.3, p.415-422, 2014.

MITCHELL, E. S. et al. Differential contributions of theobromine and caffeine on mood, psychomotor performance and blood pressure. **Physiology and Behaviour**. v.104, n.5, p.816–822, 2011.

MLADINOV, M. et al. Gene expression profiling of the dorsolateral and medial orbitofrontal cortex in schizophrenia. **Translational Neuroscience**, v.7, n.1, p.139 – 150, 2016.

MONTAGNER, G.F.F. dos S. et al. Toxicological effects of ultraviolet radiation on lymphocyte cells with different manganese superoxide dismutase Ala16Val polymorphism genotypes. **Toxicology In Vitro**. 24, n.5, p.1410–1416, 2010.

MONTANO, M. A. E. et al. Association between manganese superoxide dismutase (MnSOD) gene polymorphism and elderly obesity. **Molecular and Cellular Biochemistry**. v.328, n.1-2, p.33–40, 2009.

MONTANO, M. A. E. et al. Inflammatory cytokines *in vitro* production are associated with Ala16Val superoxide dismutase gene polymorphism of peripheral blood mononuclear cells. **Cytokine**, v.60, n.1, p.30-33, 2012.

MOHAMMAD, O.; OSSER, D. N. The psychopharmacology algorithm project at the Harvard South Shore Program: an algorithm for acute mania. **Harvard Review of Psychiatry**, v.22, n.5, p.274-294, 2014.

MORABITO, F. et al. Lipid peroxidation and protein oxidation in patients affected by Hodgkin's lymphoma. **Mediators of Inflammation**, v.13, n.1, p.381-383, 2004.

MORGAN, V. A. et al. Intellectual disability and other neuropsychiatric outcomes in high-risk children of mothers with schizophrenia, bipolar disorder and unipolar major depression. **The British Journal of Psychiatry**, v.200, n.4, p. 280 – 289, 2012.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n.1, p. 55-63, 1983.

MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nature Reviews Immunology**, v.8, n.12, p.958-969, 2008.

MÖLLSTEN, A et al. The V16A polymorphism in SOD2 is associated with increased risk of diabetic nephropathy and cardiovascular disease in type 1 diabetes. **Diabetologia**. v.52, n.12, p.2590–2593, 2009.

MÖSSNER, R. et al. Consensus paper of the WFSBP Task Force on Biological Markers: biological markers in depression. **The World Journal of Biological Psychiatry**, v.8, n.1, p.141-174, 2007.

MUESER, K.T., MCGURK, S.R. Schizophrenia. **Lancet**, v. 363, n. 9426, p. 2063-2072, 2004.

MUSILT, R. et al. Weight gain and antipsychotics: a drug safety review, **Expert Opinion Drug Safety**. v.14, n.1, p.73–96, 2014.

NAGAO, T., HASE, T., TOKIMITSU, I. A green tea extract high in catechins reduces body fat and cardiovascular risks in humans. **Obesity**, v.15, n.1, p.1473-1483, 2007.

NARDI, A. E.; QUEVEDO, J.; SILVA, A. G. **Esquizofrenia: teoria e clínica**. Porto Alegre: Artmed, 2015, 260 p.

NASSAR, A.; AZAB, A. N. Effects of lithium on inflammation. **ACS Chemical Neuroscience**, v.5, n.6, p.451-458, 2014.

NG, Y. P., OR, T. C., IP, N. Y. Plant alkaloids as drug leaders for Alzheimer's disease. *Neurochemistry International*, v89, n.1, p.260-270, 2015.

NORDBERG, J.; ARNÉR, E.S. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 31, p. 1287–1312, 2001.

OHNUMA, T.; ARAI, H. Significance of NMDA receptor-related glutamatergic amino acid levels in peripheral blood of patients with schizophrenia. *Progr. Neuro-Psychopharmacol.* **Biological Psychiatry**, v. 35, n. 1, p. 29-39, 2011.

OWEN, M. J.; SAWA, A.; MORTENSEN, P. B. Schizophrenia. **Lancet**. v. 388, p. 86-97, 2016.

OWEN, M. J; SAWA, A.; MORTENSEN, P. B. Schizophrenia. **Lancet**, v.30, n.1 p.112 - 128, 2016.

PADURARIU, M. et al. Evaluation of antioxidant enzymes activities and lipid peroxidation in schizophrenic patients treated with typical and atypical antipsychotics. **Neuroscience Letters**, v. 479, n. 3, p. 317-320, 2010.

PAE, C. U. et al. Manganese superoxide dismutase (MnSOD: Ala-9Val) gene polymorphism may not be associated with schizophrenia and tardive dyskinesia. **Psychiatry Research**, v.153, n.1, p.77-81, 2007.

PAN, J. et al. Comparison of the main compounds in Fuding white tea infusions from various tea types. **Food Science and Biotechnology**. v.27, n.5, p.1311-1318, 2018.

PALACZ-WROBEL, M. et al. Effect of apigenin, kaempferol and resveratrol on the gene expression and protein secretion of tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and interleukin-10 (IL-10) in RAW-264.7 macrophages. **Biomedicine and Pharmacotherapy**. v.93, n.1, p.1205-1212, 2017.

PAREDES, R. M. et al. Metabolomic profiling of schizophrenia patients at risk for metabolic syndrome. **International Journal of Neuropsychopharmacology**. v.17, n.8, p.1139–1148, 2014.

PAZVANTOGLU, O. et al. Oxidative mechanisms in schizophrenia and their relationship with illness subtype and symptom profile. **Psychiatry Clinical Neurosciences**, v.63, n.5, p.693-700, 2009.

PERKOVIC, N.M. et al. Monoamine oxidase and agitation in psychiatric patients. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v.1, n.69, p.131 - 146, 2016.

PERRY, B. D.; POLLARD, R. **Homeostasis, stress, trauma, and adaptation: a neurodevelopmental view of childhood trauma. Child and adolescent psychiatric clinics of North America**. Philadelphia: W.B. Saunders, p.33–52, 1998.

PHILLIPS, E. J. et al. Drug hypersensitivity: Pharmacogenetics and clinical syndromes. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. v.127, n.3, p.60-66, 2011.

PILLAI, A. et al. Long-term antipsychotic treatments and crossover studies in rats: differential effects of typical and atypical agents on the expression of antioxidant enzymes and membrane lipid peroxidation in rat brain. **Journal of Psychiatric Research**, v.41, n.5, p.372-386, 2007.

POPOVIC, D. et al. Risk factors for suicide in schizophrenia: systematic review and clinical recommendations. **Acta Psychiatrica Scandinavica**, v.130, n.6, p. 418 – 426, 2014.

PORTELLA, R. L. et al. Guaraná (*Paulinia cupana* Kunth) effects on LDL oxidation in elderly people: an in vitro and in vivo study. **Lipids Health Disease**, v.12, n.12, p.1-9, 2013.

POTUZAK, M. et al. Categorical vs dimensional classifications of psychotic disorders. **Comprehensive Psychiatry**, v.53, n.8, p. 1118–1129, 2012.

POURVALI, K.; ABBASI, M; MOTTAGHI, A. Role of superoxide dismutase 2 gene Ala16Val polymorphism and total antioxidant capacity in diabetes and its complications. **Avicenna Journal of Medical Biotechnology**. v.8, n.2, p.48–56, 2016.

RADHAKRISHNAN, R.; KASER, M.; GULOXSUZ, S. The Link between the Immune System, Environment, and Psychosis. **Schizophrenia Bulletin**. v.43, n.4, p.693–697, 2017.

RANG, H. P. **Farmacologia**. 8 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

RAJIV, R.; MUZAFFER, K.; GULOXSUZ, S. The link between the immune system, environment, and psychosis. **Schizophrenia Bulletin**. v.43, n.4, p.693-697, 2017.

RAZAVI, B. M., LOOKIAN, F., HOSSEINZADEH, H. Protective effect of green tea on olanzapine-induced-metabolic syndrome in rats. **Biomedicine Pharmacotherapy**, v.92, n.1, p.726-731, 2017.

REYAZUDDIN, M. et al. Oxidative stress and level of antioxidant enzymes in drug-naive schizophrenics. **Indian Journal of Psychiatry**, v.56, n.4, p.344-349, 2014.

RIBEIRO, J. A., SEBASTIÃO, A. M. Caffeine and adenosine. **Journal of Alzheimer's Disease**. v.20, n.1, p.3-15, 2010.

RUBEŠA, G.; GUDELJ, L.; KUBINSKA, N. Etiology of schizophrenia and therapeutic options. **Psychiatria Danubina**, v.23, n.3, p.308-315, 2011.

RUBIN, D. M. et al. Risk for incident diabetes mellitus following initiation of second-generation antipsychotics among Medicaid-enrolled youths. **JAMA Pediatrics**. v.169, n.4, e150285, 2015.

SADOCK, B. J.; SADOCK, V. A.; RUIZ, P. **Compêndio de psiquiatria: ciência do comportamento e psiquiatria clínica**. 11. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

SADOWSKA-BARTOSZ, I. Antioxidant properties of atypical antipsychotics drugs used in the treatment of schizophrenia. **Schizophrenia Research**, v.176, n.2-3, p.245-251, 2016.

SARIASLAN, A.; LARSSON, H.; FAZEL, S. Genetic and environmental determinants of violence risk in psychotic disorders: a multivariate quantitative genetic study of 1.8 million Swedish twins and siblings. **Molecular Psychiatry**, v, 21, n.9, p.1251 – 1256, 2016.

SARVÁRI, A. K. et al. Atypical antipsychotics induce both proinflammatory and adipogenic gene expression in human adipocytes *in vitro*. **Biochemical & Biophysical Research Communications**, v.450, n.4, p.1383-1389, 2014.

SAWA, A.; SEDLAK, T.W. Oxidative stress and inflammation in schizophrenia. **Schizophrenia Research**, v.176, n.1, p. 1-12, 2016.

SCHIAVONE, S; TRABACE, L. Inflammation, stress response, and redox dysregulation biomarkers: Clinical outcomes and pharmacological implications for psychosis. **Frontiers in Psychiatry**. v.8, n.3, p.1-10, 2017. doi:10.3389/fpsyt.2017.00203.

SCHIMPL, F. C. et al. Guarana: Revisiting a highly caffeinated plant from the Amazon. **Journal of Ethnopharmacology**, v.150, n.1, p.14-31, 2013. doi:10.1016/j.jep.2013.08.023.

SCHNEIDER, R.B.; IOUTINETS, J; RICHARD, I. H. Parkinson's disease psychosis: presentation, diagnosis and management. **Neurodegenerative Disease Management**. v.7, n.6, p.365–376, 2017.

SCHOTT, K. L. et al. Superoxide-hydrogen peroxide genetic imbalance modulates differentially the oxidative metabolism on human peripheral blood mononuclear cells exposed to seleno-L-methionine. **Chemico-Biological Interactions**. v.273, n.1, p.18–27, 2017.

SCHOTT, K. L. et al. Brazil nut improves the oxidative metabolism of superoxide-hydrogen peroxide chemically-imbalanced human fibroblasts in a nutrigenomic manner. **Food Chemical and Toxicology**. v.121, n.1, p.519-526, 2018.

SHASTRY, B. S. Pharmacogenetics and the concept of individualized medicine. **Pharmacogenomics Journal**. v.6, n.1, p.16–21, 2006.

SHIMIZU, E. et al. Serum brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in schizophrenia are indistinguishable from controls. **Neuroscience Letters**, v.351, n.2, p.111–114, 2003.

SHIRAKAWA, I.; CHAVES, A.C.; MARI, J. **O desafio da esquizofrenia**, 3 ed. São Paulo: Atheneu, 2015.

SILVA, F. C. C. et al. Behavioral alterations and pro-oxidant effect of a single ketamine administration to mice. **Brain Research Bulletin**, v. 83, p. 9-15, 2010.

SILVA, P. **Farmacologia**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

ŞİMŞEK, Ş. et al. Oxidative Stress and DNA Damage in Untreated First-Episode Psychosis in Adolescents. **Neuropsychobiology**, v.73, n.1, p.92-97, 2016.

SIROTA, P. et al. Difference in inflammatory cytokine production by mononuclear cells from obese and non-obese schizophrenic patients. **Acta Psychiatrica Scandinavica**, v.132, n.4, p.1 – 5, 2015.

SODERLUND, J. et al. Activation in brain interleukin-1beta in schizophrenia. **Molecular Psychiatry**, v.14, n.1, p.1069 – 1071, 2009.

SOUZA, A. H. P. et al. Phytochemicals and bioactive properties of *Ilex paraguariensis*: An in-vitro comparative study between the whole plant leaves and stems. **Food Research International**. v.78, n.1, p.286-294, 2015.

STAAL, W.G. et al. Neuropsychological dysfunctions in siblings discordant for schizophrenia. **Psychiatry Research**, v. 95, n. 3, p. 227-235, 2000.

STAHL, S.M; SHAYEGAN D.K. The psychopharmacology of ziprasidone: receptorbinding properties and real-world psychiatric practice. **The Journal of Clinical Psychiatry**. v.64, n.19, p.6–12, 2003.

STIMMEL, G. L., GUTIERREZ, M. A.; LEE, V. Ziprasidone: An atypical antipsychotic drug for the treatment of schizophrenia. **Clinical Therapeutics**, v. 24, n. 1, p. 21-37, 2002.

STIP, E. et al. Ziprasidone for Psychotic Disorders: A Meta-Analysis and Systematic Review of the Relationship Between Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and Clinical Profile. **Clinical Therapeutics**. v.33, n.12, p.1853–1867, 2011.

STROUS, R.D.; SHOENFELD, Y. Schizophrenia, autoimmunity and immune system dysregulation: a comprehensive model updated and revisited. **Journal Autoimmunity**, v.27, n.2, p.71 – 80, 2006.

SUMIYOSHI, T. et al. Membrane fatty acid levels as a predictor of treatment response in chronic schizophrenia. **Psychiatry Research**, v.186, n.1, p.23-27, 2011.

SUNIL, V. R. et al. Pentoxifylline attenuates nitrogen mustard-induced acute lung injury, oxidative stress and inflammation. **Experimental and Molecular Pathology**. v.97, n.1, p.89–98, 2014.

SUTTON, A et al. The Ala16Val genetic dimorphism modulates the import of human manganese superoxide dismutase into rat liver mitochondria. **Pharmacogenetics**. v.13, n.3, p.145–157, 2003.

ŠVOB, Š. D.; PIVAC, N.; MÜCK-ŠELER, D. The serotonergic system and cognitive function. **Translational Neuroscience**, v.7, n.1, p.35 – 49, 2016.

TACIAK, B. et AL. Evaluation of phenotypic and functional stability of RAW 264.7 cell line through serial passages. **PLoS ONE**. v.13, n.6, p.1-13, e:0198943, 2018. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198943>

TAKEUCHI, H. et al. Antipsychotic polypharmacy and corrected QT interval: a systematic review. **The Canadian Journal of Psychiatry**. v.60, n.5, p.215–222, 2015.

TANDON, R.; NASRALLAH, H. A.; KESHAVAN, M. S. Schizophrenia, “Just the Facts”: 5. Treatment and prevention Past, present, and future **Schizophrenia Research**, v. 122, n.1-3, p. 1-23, 2010.

TANG, Q. J. [Comparative study about the effect of aripiprazole and olanzapine on body mass, glycolipid metabolism in patients with first-episode schizophrenia]. **Jing Shen Yi Xue Za Zhi**. v.24, n.5, p.348-349, 2011.

TANG, L.S. et al. Safe and effective sofosbuvir-based therapy in patients with mental health disease on hepatitis C virus treatment. **World Journal of Hepatology**, v.8, n.31, p. 1318 -1326, 2016.

TANIGUCHI, E. et al. Lipid profile is associated with the incidence of cognitive dysfunction in viral cirrhotic patients: a data-mining analysis. **Hepatology Research**, v.43, n.4, p.418-424, 2013.

TEK, C. et al. Antipsychotic-induced weight gain in first-episode psychosis patients: a meta-analysis of differential effects of antipsychotic medications. **Early Intervention in Psychiatry**. v.10, n.3, p.193–202, 2016.

TER CHAO, C. et al. Interplay between Superoxide Dismutase, Glutathione Peroxidase, and Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma Polymorphisms on the Risk of End-Stage Renal Disease among Han Chinese Patients. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. v.2016, p.1-7, 2016. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/8516748>

TORNIO, A.; BACKMAN, J. T. Cytochrome P450 in Pharmacogenetics: An Update. **Advances in Pharmacology**. v.2018, n.1, pp.3–32, 2018. doi:10.1016/bs.apha.2018.04.007.

UGUZ, F. et al. Weight gain and associated factors in patients using newer antidepressant drugs. **General Hospital Psychiatry**, v.37, n.1, p. 46 – 48, 2015.

ULRICH, S. et al. Feeling smart: effects of caffeine and glucose on cognition, mood and self-judgement. **Physiology & Behaviour**, v.151, n.1, p.629-637, 2015.

WANG, D. F. et al. Meta-Analyses of Manganese Superoxide Dismutase Activity, Gene Ala-9Val Polymorphism and the Risk of Schizophrenia, **Medicine (Baltimore)**, v.94, n.36, e1507, 2015.

WANG, Q. et al. Genetic factor common to schizophrenia and HIV infection is associated with risky sexual behavior: antagonistic vs. synergistic pleiotropic SNPs enriched for distinctly different biological functions. **Human Genetics**, v.136, n.1, p.75 – 83, 2017.

WANG, P. et al. Association between *MnSOD* Val16Ala Polymorphism and Cancer Risk: Evidence from 33,098 Cases and 37,831 Controls. **Disease Markers**. v.2018, n.1, p.1–16. doi:10.1155/2018/3061974.

WEIGERT, A. et al. Redox-signals and macrophage biology. **Molecular Aspects of Medicine**. v.63, n.1, p.70-87, 2018. doi: 10.1016/j.mam.2018.01.003.

WEI, Q. et al. Reduced serum levels of triglyceride, very low density lipoprotein cholesterol and apolipoprotein B in Parkinson's disease patients. **PLoS One**, v.8, n.9, e75743. 21, 2013.

WERNER, C. et al. A chemical compound based on methylxanthine-polyphenols lowers nitric oxide levels and increases post-thaw human sperm viability. **Zygote**, v.25, n.6, p.719-730, 2017.

WETTERLING, T. Bodyweight gain with atypical antipsychotics. A comparative review. **Drug Safety**, v.24, n.1, p.59-73, 2001.

WILNER, K. D. et al. Ziprasidone and the activity of cytochrome P450 2D6 in healthy extensive metabolizers. **The British Journal of Clinical Pharmacology**, v.49, n.1, p.43S-47S, 2000.

WOLFERSDORF, M. et al. Suicide in psychiatric hospitals: Results, risk factors and therapeutic measures. **Nervenarzt**, v.87, n.5, p.474-482, 2016.

WOO, K. S. et al. Neutrophil-to-lymphocyte Ratio is associated with impaired interferon-gamma release to phytohemagglutinin. v.10, n.5, e:0125794, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Mental disorders**. Genebra, 2016. Disponível em: <http://www.portal.pmnch.org/mediacentre/factsheets/fs396/en/>>. Acesso em: 02 fev. 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Schizophrenia**. Disponível em: http://www.who.int/mental_health/management/schizophrenia/en//>. Acesso em: 03 fev. 2017.

VALLS, A.C.S. **Achados histopatológicos e comportamentais em modelo experimental de esquizofrenia induzida por-MAM-acetato de metilazoximetanol**. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

VASCONCELOS, S.M. L. et al. Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v.30, n.1, p.1323-1338, 2007.

VASKINN, A. et al. Reading Emotions from Body Movement: A Generalized Impairment in Schizophrenia. **Frontiers in Psychology**, v.6, n.1, p.1-7, 2016.

VASKINN, A. et al. Theory of mind in women with borderline personality disorder or schizophrenia: differences in overall ability and error patterns. **Frontiers in Psychology**, v.6, n.1, p.1-7, 2015.

VESKOUKIS, A. S.; TSATSAKIS, A. M.; KOURETAS, D. Dietary oxidative stress and antioxidant defense with an emphasis on plant extract administration. **Cell Stress And Chaperones**, v. 17, n. 1, p.11-21, 2011.

VOICULESCU, M. et al. Molecular and pharmacodynamic interactions between caffeine and dopaminergic system. **Journal of Medicine and Life**. v.7, n.4, p.30–38, 2014.

YADAV, R. S.; TIWARI, N. K. Lipid integration in neurodegeneration: an overview of Alzheimer's disease. **Molecular Neurobiology**, v.50, n.1, p.168-176, 2014.

YAO, J.K. KESHAVAN, M.S. Antioxidants, redox signaling, and pathophysiology in schizophrenia: An integrative view. **Antioxidants & Redox Signaling**, v.15, n.1, p.2011–2035, 2011.

YAVARIAN, J. et al. Type specific Real time PCR for detection of human herpes virus 6 in schizophrenia and bipolar patients: a case control study. **Psychiatry (BMC)**, v.15, n.296, p. 1 – 6, 2015.

YOON, S.C. et al. Linkage and Association Analyses of Schizophrenia with Genetic Variations on Chromosome 22q11 in Koreans. **Psychiatry Investigation**, v.13, n. 6, p. 630 – 636, 2016.

ZAI, C. C. Oxidative stress in tardive dyskinesia: genetic association study and meta-analysis of NADPH quinone oxidoreductase 1 (NQO1) and Superoxide dismutase 2 (SOD2, MnSOD) genes. **Progress in Neuro-psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v.34, n.1, p.50-56, 2010.

ZARGAR, S., AL-MAJED, A. A., WANI, T. A. Potentiating and synergistic effect of grapefruit juice on the antioxidant and anti-inflammatory activity of aripiprazole against hydrogen peroxide induced oxidative stress in mice. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.18, n.1, p.106-114, 2018.

ZHANG, S.; LAN, G. Prospective 8-week trial on the effect of olanzapine, quetiapine, and aripiprazole on blood glucose and lipids among individuals with first-onset schizophrenia. **Shanghai Archives of Psychiatry**, v.26, n.6, p.339-346, 2014.

ZHANG, X. Y. et al. Changes in serum interleukin-2, -6, and -8 levels before and during treatment with risperidone and haloperidol: relationship to outcome in schizophrenia. **Journal Clinical Psychiatry**, v.65, n.7, p.940 – 947, 2004.

ZHANG, X. Y. et al. Clinical symptoms and cognitive impairment associated with male schizophrenia relate to plasma manganese superoxide dismutase activity: a case-control study. **Journal of Psychiatric Research**, v.47, n.8, p.1049-1053, 2013.

ZHANG, X. Y. et al. The interplay between BDNF and oxidative stress in chronic schizophrenia. **Psychoneuroendocrinology**, v.51, n.1, p.201-208, 2014.

ZHANG, X. Y. et al. Association of the manganese superoxide dismutase gene Ala-9Val polymorphism with age of smoking initiation in male schizophrenia smokers, **American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics**, v.171B, n.2, p.243-249, 2016.

ZHANG, Z et al. The increased activity of plasma manganese superoxide dismutase in tardive dyskinesia is unrelated to the Ala-9Val polymorphism. **Journal of Psychiatric Research**, v.36, n.5, p.317-324, 2002.

ZHONG, Y. et al. Anti-inflammatory activity of lipophilic epigallocatechin gallate (EGCG) derivatives in LPS-stimulated murine macrophages. **Food Chemistry**. v.134, n.2, p.742–748, 2012.

ZHUO C. et al. Brain structural and functional dissociated patterns in schizophrenia. **Psychiatry (BMC)**, v.17, n.1, p.45-59, 2017.

ZIPRASIDONA: cloridrato de ziprasidona. Rio de Janeiro: Laboratório Farmacêutico da Marinha, 2015. Bula de remédio.

ZORTÉA, K. Significant weight loss in patients with schizophrenia in long-term hypocaloric diet: a pilot study. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, [Epub ahead of print], 2016.

ZUCCATO, C.; CATTANO, E. Role of brain-derived neurotrophic factor in Huntington's disease. **Progress in Neurobiology**, v.81, n.5-6, p.294-330, 2007.

ANEXO A – COMPROVANTE DE PUBLICAÇÃO DO ARTIGO 1



Ziprasidone, a second-generation antipsychotic drug, triggers a macrophage inflammatory response *in vitro*

Thiago Duarte^{a,1}, Fernanda Barbisan^{a,1}, Pedro Antônio Schmidt do Prado-Lima^b,
Verônica Farina Azzolin^a, Ivo Emílio da Cruz Jung^a, Marta Maria Medeiros Frescura Duarte^d,
Cibele Ferreira Teixeira^a, Moises Henrique Mastella^d, Ivana Beatrice Mânica da Cruz^{a,c,e,*}

^a Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

^b Instituto do Cérebro, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

^c Laboratório de Biogenômica, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

^d Universidade Luterana do Brasil Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

^e Programa de Pós-Graduação em Gerontologia, Centro de Educação Física e Desporto, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Ziprasidone
Antipsychotic drug
Inflammation
Allergen
Mononuclear cell

ABSTRACT

Antipsychotic drugs are used to treat schizophrenia and other psychiatric disorders. However, most of these drugs present side effects causing obesity and other serious metabolic alterations that correlate with grade of chronic inflammation. In contrast, ziprasidone's (ZIP) metabolic side effects are attenuated relative to those of other antipsychotic drugs, but some reports suggest that this drug could cause allergic, hypersensitive reactions in susceptible patients. At present, the mechanism of ZIP's effect on peripheral inflammatory metabolism is not well characterized. We conducted an *in vitro* study to evaluate the effect of ZIP on a macrophage cell line (RAW 264.1). Our results showed that in non-activated macrophage cells, ZIP exposure initiated macrophage spreading; increased cellular proliferation, as evaluated by MTT and flow cytometry assays; and presented higher levels of oxidant molecules involved in the inflammatory response (nitric oxide, superoxide, reactive oxygen species), and proinflammatory cytokines (IL-1, IL-6, TNF α , INF γ). Levels of IL-10, an anti-inflammatory cytokine were lower in ZIP-exposed cells. These effects were less potent than those caused by the positive control for inflammation induction (phytohemagglutinin), and more intense than the effects of lithium (LI), which was used as an anti-inflammatory molecule. ZIP also modulated cytokine gene expression. Taken together, these data suggest that ZIP can produce a peripheral inflammatory response, and this response may explain the allergen-inflammatory response observed in some patients treated with this antipsychotic drug.


ANEXO B – COMPROVANTE DE PUBLICAÇÃO DO ARTIGO 2

Inflammation (© 2018)
DOI: 10.1007/s10753-018-0946-9



ORIGINAL ARTICLE

The Influence of a Xanthine-Catechin Chemical Matrix on *in vitro* Macrophage-Activation Triggered by Antipsychotic Ziprasidone

Thiago Duarte,¹ Fernanda Barbisan ,^{2,3,7} Beatriz Sadigurski Nunes da Cunha,³ Verônica Farina Azzolin,² Bárbara Osmarin Turra,³ Marta Maria Medeiros Frescura Duarte,⁴ Ivo Emilio da Cruz Jung,¹ Euler Esteves Ribeiro,⁵ Pedro Antônio do Prado-Lima,⁶ and Ivana Beatrice Mânica da Cruz^{1,2}

Abstract—Ziprasidone (ZIP) is an effective antipsychotic with low side effects than other second-generation antipsychotics. Despite this, there are reports of adverse events and previous studies associating the use of ZIP the inflammatory response. It is possible to infer that bioactive molecules present in some foods could attenuate peripheral inflammatory and oxidative stress potentially triggered ZIP. This is the case of guaraná xanthine-catechin chemical matrix (XC-Mix) that presents caffeine, theobromine, and catechin. The *in vitro* protocols using murine RAW 264.7 cell macrophages were ZIP-exposure in culture medium supplemented with chemical isolated and admixture of Caf, The, and Cat. Main results showed that supplementation with isolated and XC-mix had a lowering effect on 72 h macrophages proliferation. XC-mix with 1:1:1 proportion at 25 µg/mL of each caffeine, theobromine, and catechin, molecules present lowering effect on nitric oxide levels, oxidative stress markers (DNA oxidation quantified by 8-hydroxy-2' -deoxyguanosine), lipoperoxidation, and protein carbonylation. XC-mix also decreased protein levels and downregulated genes of proinflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF- α). At contrary, XC-Mix increased levels and upregulated gene of anti-inflammatory IL-10 cytokine. The

ANEXO C – ERRATA DE PUBLICAÇÃO DO ARTIGO 2

Inflammation (© 2019)
DOI: 10.1007/s10753-019-00974-7



CORRECTION

Correction to: The Influence of a Xanthine-Catechin Chemical Matrix on *in vitro* Macrophage-Activation Triggered by Antipsychotic Ziprasidone

Thiago Duarte,¹ Fernanda Barbisan,^{2,3,7} Beatriz Sadigurski Nunes da Cunha,³ Verônica Farina Azzolin,² Bárbara Osmarin Turra,³ Marta Maria Medeiros Frescura Duarte,⁴ Ivo Emilio da Cruz Jung,¹ Euler Esteves Ribeiro,⁵ Pedro Antônio do Prado-Lima,⁶ and Ivana Beatrice Mânica da Cruz^{1,2}

Correction to: *Inflammation*

<https://doi.org/10.1007/s10753-018-0946-9>

After publication of our article it came to our attention that it contains a number of errors with regard to the citations. The details are provided below:

In Background section, 3rd paragraph: the correct citation is reference [8].

4th paragraph: “This is the case of chemical matrix present in beverages, such as green and black tea [8], yerba mate [9] and guaraná [10, 11]” should be “This is the case of

chemical matrix present in beverages, such as in some teas [9], yerba mate [10] and guaraná [11, 12].”

In the sentence: “Guaraná powder is broadly used to produce energetic beverages in the world [12,13]. Previous *in vivo* and *in vitro* studies have described that guaraná extract could have some antioxidant [13, 14] and anti-inflammatory effects [13–16]” should be “Guaraná powder is broadly used to produce energetic beverages around the world [12, 13]. Previous *in vivo* and *in vitro* studies have indicated that guaraná extract could have some antioxidant [11, 14] and anti-inflammatory effects [15–16].”

The online version of the original article can be found at <https://doi.org/10.1007/s10753-018-0946-9>

¹ Postgraduate Program in Pharmacology, Federal University of Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil

² Postgraduate Program of Gerontology, Federal University of Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil

³ Biogenomic Laboratory, Center of Health Sciences, Federal University of Santa Maria (UFSM), Roraima Avenue 1000, Building 19, Chamber 3102, Santa Maria, RS, Brazil

⁴ Center of Health Sciences, Lutheran University of Brazil (ULBRA), Santa Maria, RS, Brazil

⁵ Foundation Open University of the Third Age, Manaus, AM, Brazil

⁶ Brain Institute, Catholic University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil



⁷ To whom correspondence should be addressed at Biogenomic Laboratory, Center of Health Sciences, Federal University of Santa Maria (UFSM), Roraima Avenue 1000, Building 19, Chamber 3102, Santa Maria, RS, Brazil. E-mail: fernandabarbisan@gmail.com

The former reference [13] (Pandiaraj P, Gnavavelbabu A, Saravanan P. Synthesis of CuO nanofluids and analysis of its increased effective thermal conductivity for flat plate heat pipe. *International Journal of ChemTech Research*. 2015; 8(4):1972) should be removed and replaced with the reference [15] (Higgins JP, Kavita B, Deuster PA, Shearer J. *Energy Drinks: A Contemporary Issues Paper*. *Current Sports Medicine Report*. 2018; 17:65–72).

In Methods section, Bittencourt et al. [10] should be Bittencourt et al. [11].

In the sentence: “A colorimetric produce measure at 540 nm is obtained from this reaction that is proportional

ANEXO D – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA (CONEP)

 <p>MINISTÉRIO DA SAÚDE Conselho Nacional de Saúde Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)</p>	<p>UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa Comitê de Ética em Pesquisa - CEP- UFSM REGISTRO CONEP: 243</p> 
--	---

CARTA DE APROVAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa – UFSM, reconhecido pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – (CONEP/MS) analisou o protocolo de pesquisa:

Título: Estudos in vitro em células humanas e linhagens celulares de extratos e compostos bioativos presentes em alimentos da dieta Amazônica

Número do processo: 23081.015838/2011-10

CAAE (Certificado de Apresentação para Apreciação Ética): 0332.0.243.000-11

Pesquisador Responsável: Ivana Beatrice Manica da Cruz

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes estabelecidas na Resolução 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde. Toda e qualquer alteração do Projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente a este Comitê. O pesquisador deve apresentar ao CEP:

Janeiro/ 2013- Relatório parcial

Janeiro/ 2014- Relatório parcial

Janeiro/ 2015-Relatório parcial

Janeiro/ 2016- Relatório final

Os membros do CEP-UFSM não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores.

DATA DA REUNIÃO DE APROVAÇÃO: 13/12/2011