

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

Bárbara Osmarin Turra

**EFEITO MODULATÓRIO *IN VITRO* DA QUETIAPINA NÃO-
METABOLIZADA NA CITOTOXICIDADE E ATIVAÇÃO
INFLAMATÓRIA DE CÉLULAS BRANCAS E NA FORMAÇÃO DE
ARMADILHAS EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS**

Santa Maria, RS
2020

Bárbara Osmarin Turra

**EFEITO MODULATÓRIO *IN VITRO* DA QUETIAPINA NÃO-METABOLIZADA NA
CITOTOXICIDADE E ATIVAÇÃO INFLAMATÓRIA DE CÉLULAS BRANCAS E NA
FORMAÇÃO DE ARMADILHAS EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS**

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fernanda Barbisan

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

Santa Maria, RS
2020

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Turra , Bárbara Osmarin
EFEITO MODULATÓRIO IN VITRO DA QUETIAPINA NÃO
METABOLIZADA NA CITOTOXICIDADE E ATIVAÇÃO INFLAMATÓRIA DE
CÉLULAS BRANCAS E NA FORMAÇÃO DE ARMADILHAS
EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS / Bárbara Osmarin Turra .-
2020.
92 p.; 30 cm

Orientadora: Fernanda Barbisan
Coorientadora: Ivana Beatrice Mânica da Cruz
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Farmacologia, RS, 2020

1. Antipsicóticos 2. Sistema Imune 3. Sistema Nervoso
4. Inflamação Crônica I. Barbisan, Fernanda II. Mânica da
Cruz, Ivana Beatrice III. Título.

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

© Todos os direitos autorais reservados a Bárbara Osmarin Turra. A reprodução de partes ou do todo desse trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.
Endereço: Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Laboratório de Biogenômica– Avenida Roraima, n.1000, Bairro Camobi, Santa Maria, RS.
CEP: 97105-900.
Fone: 55 3220-8000; E-mail: babi_turra@hotmail.com.

Bárbara Osmarin Turra

**EFEITO MODULATÓRIO *IN VITRO* DA QUETIAPINA NÃO-METABOLIZADA NA
CITOTOXICIDADE E ATIVAÇÃO INFLAMATÓRIA DE CÉLULAS BRANCAS E NA
FORMAÇÃO DE ARMADILHAS EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS**

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

Aprovada em 19 de fevereiro de 2020:

Fernanda Barbisan, Dra. (UFSM)
(Presidente/Orientadora)

Maria Amália Pavanato, Dra. (UFSM)

Daniele Rubert Nogueira-Librelotto, Dra. (UFSM)

Santa Maria, RS
2020

AGRADECIMENTOS

“Ninguém é feliz sozinho”; É com esse pensamento que uso desse espaço como forma de gratidão a todos que estenderam a mão, e que me apoiaram na concretização desse sonho.

Agradeço primeiramente a Deus, por me permitir seguir com estabilidade emocional e nunca desanimar! Obrigada por guiar meu caminho.

Aos meus pais, Primo Antônio Turra e Marlene T. Osmarin Turra por todo apoio, por abdicar de muitos de seus sonhos para apoiar os meus, por ser minha fortaleza. Por entenderem a distância, e não vê-la como empecilho. Obrigada, eu amo vocês!

Ao Emaús- SM, obrigada pela “terapia” de todas as terças- feiras.

A minha muito mais que prima Juliana Turra Zanatta, muito obrigada pelo apoio, pelas palavras e pela insistência junto comigo. Amo você.

As minhas amigas, Cristieli, Giseli, Sabrina, Chari, Camila, Maiely e Manu, presentes da graduação e irmãs de vida. Obrigada por me ouvirem e compartilharem todos os momentos bons e ruins, que a vida adulta emprega.

Aos meus avós Albino Turra (in memorian) e Caetano Osmarin (in memorian) e as minhas avós Angelina Turra (in memorian) e Maria Osmarin (in memorian) obrigada por todas as boas energias emanadas. Tenho certeza da felicidade de vocês nesse plano evoluído. Senti em todos os momentos as vossas presenças.

A minha família como um todo, que toda às vezes dava-me mais persistência e me ensinaram o verdadeiro valor da humildade. Obrigada!

A Verônica Azzolin, obrigada por todo o conhecimento compartilhado: científico e de vida. Obrigada por essa energia e por todo o apoio nas minhas decisões. Amo você!

A minha orientadora e muito mais que isso, minha amiga de infância Fernanda Barbisan. Obrigada por me “aturar” e por nunca largar minha mão nos momentos mais difíceis. Obrigada por toda a orientação e paciência. Obrigada pelos conselhos mais sinceros e por toda a torcida. Tu me inspiras. Amo você!

A minha orientadora Ivana Beatrice Mânica da Cruz, obrigada por abrir as portas do laboratório e me acolher tão bem. Obrigada por ser essa pessoa que me fez crescer tanto.

Aos meus colegas de laboratório: Audrei Alves, Charles E. Assmann, Cibele F. Teixeira, Grazielli Castagna, Ivo E. Jung, Izabel Roggia, Moisés H. Mastella, Thamara G. Flores e Nathalia Bonotto por todos os problemas da pós – graduação e de vida divididos. Obrigada por serem muito mais que colegas de trabalho.

A iniciação científica como um todo, em especial: Beatriz Sadigursky, Bruna Chitolina, Daniel Nerys, Danieli Pillar, e Luiza Braum que estiveram mais presentes nesse trabalho, dando apoio e me auxiliando sem esitar.

Aos meus colegas que são presentes da pós- graduação: Erica Furlan, Felipe Schmiddel e Alice Rosa. Obrigada por todo apoio e pelas longas conversas sobre a difícil vida da ciência (risos).

A Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) junto com o Programa de Pós- Graduação em Farmacologia, que por meio de seus professores possibilitou-me o crescimento profissional e pessoal.

A Zeli, por toda sua paciência, bom humor e eficiência.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte e apoio financeiro.

A todos que acreditam na ciência do Brasil, que reconhecem seu valor e priorizam a educação como base. Obrigada por depositarem em nós a esperança de um futuro melhor.

EPÍGRAFE

Felizes aqueles que são portadores de nova vida, de novas oportunidades. Felizes quantos trabalham para isso, aqueles que lutam para isso.

(Papa Francisco)

RESUMO

EFEITO MODULATÓRIO *IN VITRO* DA QUETIAPINA NÃO-METABOLIZADA NA CITOTOXICIDADE E ATIVAÇÃO INFLAMATÓRIA DE CÉLULAS BRANCAS E NA FORMAÇÃO DE ARMADILHAS EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS

AUTORA: Bárbara Osmarin Turra
ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Fernanda Barbisan
COORIENTADORA: Prof^a. Dr^a Ivana Beatrice Mânica da Cruz.

A quetiapina (QUE) é um fármaco altamente complexo que por suas diferentes formas de interação com os receptores apresenta grande aplicabilidade clínica. Embora muito utilizada, a QUE traz consigo uma gama de efeitos colaterais que incluem além de distúrbios da via metabólica, alterações em nível de sistema imune. Rapidamente metabolizada pelo fígado ela é transformada em seu principal metabólito ativo, a norquetiapina, estando então, à depuração da QUE em apenas 5%. Este percentual pode aumentar em pessoas idosas, com insuficiência hepática ou através da interação com outros fármacos. Com isso, a quetiapina não metabolizada (nmQUE) pode ser responsável pela indução das alterações imunológicas periféricas, principalmente a inflamação crônica de baixo grau. Assim, nosso objetivo concentrou-se em avaliar *in vitro* o potencial efeito citotóxico e modulatório da nmQUE na ativação inflamatória e, na formação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs). Para isso, foram realizados experimentos celulares, utilizando a linhagem celular comercial de macrófagos (RAW 264.7), além de leucócitos e neutrófilos, obtidos através de coleta sanguínea de voluntários. As células foram cultivadas em condições ideais conforme a padronização até a obtenção da concentração de 1×10^5 cél/mL. Em seguida, os macrófagos, leucócitos e neutrófilos foram tratados e ativados ou não com agente mitogênico, a fitohemaglutinina (PHA). Após 24 horas, foram tratados com diferentes concentrações de QUE (25, 50, 100, 200 e 400 µg/L). Dada às 24 horas do tratamento, foi avaliada a viabilidade celular e citotoxicidade de todas as células, através do ensaio espectrofotométrico do Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT). Com o resultado destes testes, foi definida a concentração de escolha da QUE para ser utilizada nas análises seguintes: 100 µg/L. Com isso, após 72 horas de tratamento, avaliou-se a proliferação celular, moléculas oxidativas e a expressão proteica e gênica (via *Quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction* (qRT-PCR) de citocinas pró- inflamatórias e anti-inflamatória em RAW 264.7. Ainda, para avaliar o efeito da nmQUE na formação de NETs, os neutrófilos foram previamente ativados ou não pela exposição a células de leveduras por 2 horas, seguidos da exposição à QUE por mais 2 horas, estando posteriormente fixados e corados, seguidos pela captura de imagens e avaliação condizente. Os resultados mostram a alta capacidade de interação da nmQUE para com as células imunológicas, não demonstrando citotoxicidade, porém modificando seu perfil inflamatório conforme seu estado inicial, corroborando assim, para com um efeito farmacológico pró e anti-inflamatório. Já em relação a formação de NETs, os neutrófilos foram induzidos surpreendentemente, estando a nmQUE responsável por uma hiperformação das NETs. Com esses resultados, conclui-se que nmQUE exerce influência nas vias do sistema imune, sendo possivelmente responsável pela existência de morbidades e efeitos colaterais, o que representa o grande problema da terapia antipsicótica.

Palavras-chave: Antipsicóticos. Sistema Imune. Macrófago. Leucócitos.

ABSTRACT

IN VITRO MODULATORY EFFECT OF NON-METABOLIZED QUETIAPINE ON CYTOTOXICITY AND INFLAMMATORY ACTIVATION OF WHITE CELLS AND FORMATION OF NEUTROPHILE EXTRACELLULAR TRAPS

AUTHOR: Bárbara Osmarin Turra
ADVISOR: Prof^a. Dr^a. Fernanda Barbisan
CO-ADVISOR: Prof^a. Dr^a. Ivana Beatrice Mânica da Cruz

Quetiapine (QUE) is a highly complex drug that, due to its different forms of interaction with receptors, has great clinical applicability. Although widely used, QUE brings with it a range of side effects that include, in addition to disorders of the metabolic pathway, changes in levels of the immune system. Quickly metabolised by the liver, it is transformed into its main active metabolite, norquetiapine, being then the clearance of QUE only 5%. This percentage may increase in elderly people, with liver failure or through interaction with other drugs. Thus, non-metabolized quetiapine (nmQUE) may be responsible for inducing peripheral immune changes, especially low-grade chronic inflammation. Therefore, our objective was to evaluate *in vitro* the potential cytotoxicity and modulatory effect of nmQUE on inflammatory activation and in the formation of extracellular neutrophil traps (NETs). For this, cellular experiments were carried out, using a commercial macrophage cell line (RAW 264.7), in addition to leukocytes and neutrophils, obtained through blood collection from volunteers. The cells were cultured under ideal conditions according to standardisation until the concentration of 1×10^5 cells/mL was obtained. Then, macrophages, leukocytes and neutrophils were treated and activated, or not, with a mitogenic agent, phytohemagglutinin (PHA). After 24 hours, they were treated with different concentrations of QUE (25, 50, 100, 200 and 400 $\mu\text{g/L}$). Given at 24 hours of treatment, the cell viability and cytotoxicity of all cells were evaluated using the 3- [4,5-dimethylthiazol-2-yl] -2,5-diphenyltetrazolium assay (MTT). With the result of these tests, the concentration of choice for QUE to be used in the following analyses was defined: 100 $\mu\text{g/L}$. Thus, after 72 hours of treatment, cell proliferation, oxidative molecules and gene and protein expression (via Quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (qRT-PCR) of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in RAW 264.7 were evaluated. In addition, to assess the effect of nmQUE on the formation of NETs, neutrophils were previously activated, or not, by exposure to yeast cells for 2 hours, followed by exposure to QUE for an additional 2 hours, then fixed and stained, followed by images capture and evaluations consistent with the experiment. The results show the high capacity of nmQUE to interact with immune cells, not showing cytotoxicity, but modifying its inflammatory profile according to its initial state, thus corroborating it with a pro and anti-inflammatory pharmacological effect. In relation to the formation of NETs, neutrophils were surprisingly induced, with nmQUE being responsible for hyperformation of NETs. With these results, it is concluded that nmQUE exerts an influence on the pathways of the immune system, being possibly responsible for the existence of morbidities and side effects, which represents the major problem of antipsychotic therapy.

Keywords: Antipsychotics. Immune system. Macrophage. Leukocytes

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Quadro 1 -	CrITÉrios para o diagnÓstico de psicose segundo o DSM –V...	17
Quadro 2 -	Efeitos secundÁrios da quetiapina comprovados pela literatura	22
Figura 1 -	Estrutura quÍmica da quetiapina.....	19
Figura 2 -	EspÉcies reativas de oxigÊnio (EROs) e sistemas antioxidantes: metabolismo oxidativo	27
Figura 3 -	Vias de ativação para a inflamação: clássica e alternativa	29
Figura 4 -	Célula da micróglia: morfologia	30
Figura 5 -	Ativação microglial e desenvolvimento das rotas de inflamação	31
Figura 6 -	Neutrófilos: processo de fagocitose	34
Figura 7 -	Mecanismos de formação de NETs dependentes de NOX	39
Figura 8 -	Mecanismo de formação de NETs independente de NOX	40
Figura 9 -	Mecanismos de formação de “NETosis suicida e NETosis vital”	42
Figura 10 -	Mecanismos de patologia induzidas ou mediadas por NETs ..	44
Figura 11 -	NETs: Modulação Inflamatória	45
Figura 12 -	Delineamento metodolÓgico geral das análises realizadas com macrófagos	50
Figura 13 -	Delineamento metodolÓgico geral das análises de viabilidade e citotoxicidade de leucÓcitos totais e neutrófilos	51
Figura 14 -	Delineamento metodolÓgico geral da avaliação de formação de NETs expostas a nmQUE	52

MANUSCRITO

Figure 1.	Viability measured by MTT-spectrophometric assay of 24 h macrophage and total leukocytes cultures and 6 h neutrophil-isolated cultures exposed to different concentrations of unmetabolized quetiapine (u-QUE)	59
Figure 2.	Inflammatory modulation of non-activated and phytohemagglutinin (PHA) activated 72 h RAW-macrophages cultures with and without unmetabolized-quetiapine (U-QUE) exposure (100 µg/L)	61
Figure 3.	Cytokines protein (A) and gene expression (B) modulation of non-activated and phytohemagglutinin (PHA) activated 72 h RAW-macrophages cultures with and without unmetabolized-quetiapine (U-QUE) exposure (100 µg/L)	63
Figure 4.	Representative optical microphotographic of neutrophil extracellular traps (NETs) formation (20 x)	64
Figure 5.	Neutrophil extracellular traps (NETs) formation	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5- HT7	Cinco hidroxitriptamina do tipo sete
5-HT1A	Cinco hidroxitriptamina do tipo um A
5-HT1B/D	Cinco hidroxitriptamina do tipo um B/D
5-HT2A	Cinco hidroxitriptamina do tipo dois A
AIM/DIA	Autoimunidade Induzida por Medicamentos
ANCA	Anticorpos Citoplasmáticos Antineutrófilos
AR	Artrite Reumatoide
ATCC	<i>do inglês, American Type Culture Collection</i>
BPI	Permeabilidade/ Bactericida
CAT	Catalase
CO ₂	Dióxido de Carbono
CR3	Receptor três do Complemento
CYP	Citocromo
D1	Receptor Dopaminérgico do tipo um
D2	Receptor Dopaminérgico do tipo dois
DAMPs	<i>do inglês, Damage-associated Molecular Pattern</i>
DCNTs	Doenças Crônicas Não Transmissíveis
DGC	Doença Granulomatosa Crônica
DMEM	<i>do inglês, Dulbecco's modified eagle médium</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DSM- V	<i>do inglês, Diagnostic and Statical Manual fifth- edition</i>
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
G- CSF	Fator Estimulante de Colônias de Granulócitos
GM-CSF	Fator estimulante de Colônias de Macrófagos e Granulócitos
GSK -3	Glicogênio Sintase Quinase Três
H1	Receptor Histamínico do tipo um
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
IFNs - I	Interferons do tipo um
IFN-γ	Interferon Gama
IL- 11β	Interleucina dois um beta
IL-12	Interleucina doze
IL-17	Interleucina dezessete
IL-1β	Interleucina um beta
IL-23	Interleucina vinte e três
IL-6	Interleucina seis
IL-8	Interleucina oito
JNK	c-Jun N-terminal kinases
LES	Lúpus Eritromatoso Sistêmico
LI	Lítio
LL-37	Peptídeo Antimicrobiano
LPS	Lipopolissacarídeo
MDT	Manual de Dissertações e Teses
MMP-9	Metaloproteinase nove da matriz
MPO	Mieloperoxidase
MTT	Brometo de três-[quatro, cinco-dimetiltiazol- dois-il]- dois, cinco-difeniltetrazólio

NADPH	Fosfato de Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina
NAT	Transportador de Noradrenalina
NE	Elastase Neutrófila
NETs	Armadilhas Extracelulares Formadas por Neutrófilos
NLRP3	Inflamassoma
nmQUE	Quetiapina não metabolizada
NODs	Nucleotídeos
NOX	NADPH-oxidase
NR	Neutral Red
O ₂ ⁻	Radical Superóxido
OH ⁻	Radical Hidroxila
ON	Óxido Nítrico
OZP	Olanzapina
PAD	Proteínas Arginina Desiminases
PAMPs	do inglês, <i>Pathogen Associated Molecular Pattern</i>
Ph	Potencial Hidrogênionico
PHA	Fitohemaglutinina
PMA	Forbol Doze Miristato Treze Acetato
PRRs	do inglês, <i>Pattern Recognition Receptors</i>
qRT-PCR	<i>Quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction</i>
QUE	Quetiapina
SBF	Soro Bovino Fetal
SCZ	Esquizofrenia
SI	Sistema Imune
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
SOD	Superóxido Dismutase
TGF-α	Fator de Crescimento Transformante alfa
TGF-β	Fator de Crescimento Transformante beta
TLRs	do inglês, <i>toll-like receptors</i>
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral alfa
TRL2	Receptor do tipo <i>Toll</i> dois
TRL4	Receptor do tipo <i>Toll</i> quatro
UFSM	Universidade Federal de Santa Maria
ZIP	Ziprasidona
α-1	Receptor Adrenérgico do tipo um
α-2	Receptor Adrenérgico do tipo dois

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	14
1 INTRODUÇÃO	15
1.1 OBJETIVOS	16
1.1.1 Objetivo geral	16
1.1.2 Objetivos específicos.....	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 PSICOSE	17
2.1.1 Epidemiologia da psicose.....	18
2.2 FÁRMACOS ANTIPSICÓTICOS.....	18
2.2.1 Quetiapina: uso farmacêutico, farmacodinâmica e farmacocinética.....	19
2.2.2 Efeitos adversos da quetiapina	21
2.2.3 Efeitos colaterais da quetiapina.....	22
2.3 TRANSTORNOS MENTAIS: INFLUÊNCIA DOS PROCESSOS OXIDATIVOS E INFLAMATÓRIOS	24
2.4 METABOLISMO OXIDATIVO/ESTRESSE OXIDATIVO	25
2.5 ASPECTOS FISIOLÓGICOS DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA	27
2.6 O PAPEL DOS NEUTRÓFILOS NO SISTEMA IMUNE INATO	32
2.7 A DESCOBERTA DAS ARMADILHAS EXTRACELULARES FORMADAS POR NEUTRÓFILOS (NETs).....	35
2.7.1 Papel das NETs na resposta inflamatória	36
2.7.2 Mecanismos de formação das NETs.....	37
2.7.3 Contextos fisiológicos da formação das NETS.....	42
2.7.4 O papel das NETS nas doenças crônicas não transmissíveis (DCNTs)	43
2.8 ANTIPSICÓTICOS COMO MODULADORES DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA.....	47
2.8.1 Efeito de psicofármacos na resposta inflamatória periférica	47
2.8.2 Efeito de psicofármacos na modulação das NETs	48
3 MATERIAIS E MÉTODOS	49
3.1 DELINEAMENTO METODOLÓGICO GERAL	49
4 RESULTADOS	52
4.1 MANUSCRITO	52
5 DISCUSSÃO	75
6 CONCLUSÃO	78
REFERÊNCIAS	79
ANEXO A – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO MANUSCRITO	92

APRESENTAÇÃO

A presente dissertação de mestrado segue as normas e recomendações do Manual de Dissertações e Teses (MDT), da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), do ano de 2015. Este trabalho buscou avaliar a citotoxicidade, a modulação da ativação inflamatória e a formação de armadilhas extracelulares formadas por neutrófilos (NETs) da quetiapina não metabolizada a partir de protocolos *in vitro* utilizando macrófagos, leucócitos e neutrófilos. Está apresentado na forma de um manuscrito, que foi submetido à revista *Psychopharmacology* com fator de impacto de 3.424, classificada no Qualis Capes - Ciências Biológicas II como A2. As seções “introdução”, “revisão bibliográfica” e “delineamento metodológico geral” encontram-se no início desta dissertação; as seções “materiais e métodos” e “resultados” encontram-se no manuscrito, que está presente na íntegra deste estudo e segue as regras da revista à qual foi enviado; as seções “discussão” e “conclusão” encontram-se no final desta dissertação, após o manuscrito. As referências bibliográficas listadas no fim da dissertação referem-se somente às citações dos itens introdução, revisão bibliográfica e discussão, uma vez que as referências utilizadas no manuscrito estão ao final dele.

1 INTRODUÇÃO

Em 2016, cerca de 40,5 milhões (71%) das 56,9 milhões de mortes no mundo eram por doenças não transmissíveis (DNTs). Desses, estima-se que 1,7 milhões (4% das mortes por DNTs) ocorreram em pessoas com menos de 30 anos, 15,2 milhões (38%) em pessoas com idade entre 30 e 70 anos e 23,6 milhões (58%) em pessoas com 70 anos ou mais (BENNETT et al., 2018). Assim, destacam-se os transtornos neuropsiquiátricos, responsáveis por 30% das DNTs e 14% do total de patologias notificadas (SOUZA, 2013).

A maior parte destes transtornos juntamente com outras morbidades neurodegenerativas, incluindo as demências, são tratados com antipsicóticos (LALLY; MACCABE, 2015; SCHNEIDER; IOURINETS; RICHARD, 2017). Apesar da eficácia destes psicofármacos, principalmente dos antipsicóticos de segunda geração, como é o caso da quetiapina (QUE), o seu uso tem sido associado a uma gama de efeitos colaterais, que incluem alterações no sistema imune e na via metabólica (MONTEBELLO; BRETT, 2017). Aparentemente, o mais investigado dos efeitos colaterais envolve a indução de estados pró-inflamatórios de baixo grau, que participam do desenvolvimento de doenças cardiometabólicas como a obesidade e o diabetes *mellitus* tipo 2 (ALONSO-PEDRERO; BESRASTROLLO; MARTI; 2019). Alterações imunológicas também têm sido relatadas com o uso da QUE, como é o caso da neutropenia, leucopenia e, mais gravemente a agranulocitose, que muitas vezes pode ser fatal (GLOCKER; GROHMANN; SCHULZ, 2017).

A ação da QUE em alterações no sistema imune periférico parece ser contraditória já que este fármaco consegue diminuir estados neuroinflamatórios presentes nos transtornos psiquiátricos. É possível que este efeito adverso seja diretamente influenciado pela farmacocinética. Administrada via ingestão oral, a QUE é rapidamente metabolizada no fígado gerando mais de 11 metabólitos, dos quais um é farmacologicamente ativo, a norquetiapina. Assim, na sua depuração apenas 5% da quetiapina não metabolizada (nmQUE) é identificada (DEVANE; NEMEROFF, 2001).

Este percentual pode aumentar em pessoas idosas, com insuficiência hepática ou através da interação com outros fármacos como: antiepilépticos e antimicrobianos. É possível que os demais metabólitos da QUE ou mesmo a nmQUE sejam os responsáveis pela indução das alterações imunológicas periféricas,

principalmente a inflamação crônica de baixo grau. Se esta hipótese é verdadeira, a exposição de células imunes responsáveis pela ativação inflamatória, como é o caso dos macrófagos e pela resposta a infecções microbianas e lesões teciduais, como é o caso dos neutrófilos poderia ser diretamente afetada pela exposição à nmQUE.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar *in vitro* o potencial efeito citotóxico e modulatório da nmQUE na ativação inflamatória e na formação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs).

1.1.2 Objetivos específicos

O potencial efeito citotóxico e modulatório da nmQUE será avaliado por protocolos *in vitro* utilizando macrófagos de linhagem comercial ativados ou não para inflamação, bem como, leucócitos e neutrófilos obtidos a partir do sangue de doadores saudáveis como modelo experimental para:

- Avaliar o efeito citotóxico da nmQUE; via ensaio Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT);
- Avaliar o efeito da nmQUE na modulação da proliferação celular, marcadores oxidativos e na expressão proteica e gênica de citocinas pró e anti-inflamatórias em macrófagos (RAW 264.7), ativados e não-ativados pela exposição a fitohemaglutinina (PHA);
- Avaliar o efeito da nmQUE na formação de NETs induzidas ou não, pela exposição a células de levedura.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PSICOSE

A psicose é um transtorno mental onde a percepção da realidade, o pensamento e a resposta afetiva mostram-se comprometidos, distorcidos ou inexistentes. Todos estes sintomas manifestam-se como fatores de interferência para o relacionamento e convívio interpessoal. O estado psicótico tem como sintomas positivos: delírios, alucinações, fala desorganizada e comportamento catatônico, além dos sintomas negativos, os quais incluem: embotamento afetivo, alogia e/ou avolição (BRUNTON; LAZO; PARKER, 2010; PIENKOS et al., 2019).

Segundo o DSM- V (*do inglês, Diagnostic and Statical Manual fifth- edition*), um quadro psicótico pode ser definido pela associação de seis critérios (quadro 1) ou quando dois ou mais sintomas manifestam-se concomitantemente, em um período de tempo significativo de ao menos um mês. Porém, apenas um critério é necessário se considerar os delírios bizarros, e alucinações acompanhadas por uma voz de comando. Na complexa sintomatologia da psicose, a esquizofrenia (SCZ) é tida como o principal transtorno psicótico (GROVER et al., 2018).

Quadro 1 - Critérios para o diagnóstico de psicose segundo o DSM –V

<p>Sintomas Positivos (adição de funções)</p> <p>Sintomas Negativos (perda de funções)</p> <p>Disfunção Social e/ ou Ocupacional</p> <p>Sinais Contínuos de Perturbação</p> <p>Exclusão de Transtorno Esquizoafetivo e Transtorno de Humor</p> <p>Exclusão de uso substâncias ilícitas</p> <p>Relação com um Transtorno Invasivo de Desenvolvimento</p>
--

Fonte: Adaptado de DSM- V

Diante desse contexto, e sabendo que a neurobiologia exerce papel importante na fisiopatologia das desordens psiquiátricas, é importante ressaltar que a causa dessas desordens não está totalmente elucidada, sendo multifatorial de alterações genéticas e/ ou ambientais, com forte envolvimento da inflamação crônica. Com isso, existem diferentes terapêuticas e fármacos empregados como tratamento, dentre estes o antipsicótico QUE (ASSCHE, 2017).

O tratamento com QUE tem efeitos terapêuticos positivos e comprovados, entretanto também inclui efeitos colaterais, como o ganho de peso e a hipertrigliceridemia, além da neutropenia e de quadros de agranulocitose (EL-SAIFI; JONES; MOYLE, 2016; LI; CAMERO, 2012). Com isso, muitos pacientes acabam por desistir do tratamento farmacológico, colocando novamente o estado de sanidade em alerta, e postulando um problema que poderia ser evitado, uma vez que os transtornos mentais afetam além do paciente, todo o entorno social, gerando impactos econômicos (VEDANA et al., 2013).

2.1.1 Epidemiologia da psicose

As doenças crônicas, principalmente as de alterações a nível de sistema nervoso central (SNC), representarão 81.1 milhões de pessoas com patologias incapacitantes, dentre elas a SCZ (SOUZA, 2013). Dessa forma, a principal carga de “incapacidade”, se tornará, até o final de 2020, a segunda maior “carga patológica” mundial (CORBANEZI, 2018). No Brasil, embora o sistema de notificação e coleta de dados envolvendo os transtornos mentais seja defasado e contenha muitas falhas (LUCCHESI et al., 2017), estima-se que 3% da população sofra com problemas mentais graves e persistentes, 6% apresente transtornos psiquiátricos graves em decorrência do uso abusivo de substâncias, como álcool e drogas e, 12% necessite de algum atendimento de saúde contínuo ou eventual (BRASIL, 2008; SANTOS; SIQUEIRA, 2010).

2.2 FÁRMACOS ANTIPSICÓTICOS

Por volta da década de 50, muitos antipsicóticos ou também chamados de neurolépticos foram descobertos, estando muitas vezes inseridos num processo

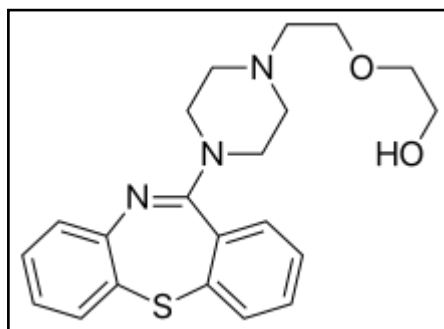
positivo relacionado à desinstitucionalização e, altas de pacientes com “tratamentos” inadequados ou longos - praticados por manicômios (BRASIL, 2013).

Segundo Sthal (2014), os antipsicóticos podem ser definidos como atípicos e típicos, estando dependente de sua ação farmacológica pela ligação aos receptores. Os fármacos típicos foram os primeiros a serem instituídos com atividade psicótica ou maníaca, estando seu antagonismo nos receptores de dopamina (D1, D2); O próprio antagonismo encontra-se envolvido em algumas reações adversas, como: o embotamento cognitivo, o surgimento de movimentos extrapiramidais e algumas alterações de pronunciamento hormonal, como a prolactina (RANG; DALE; RITTER, 2016). Enquanto que, os fármacos tidos como atípicos estabelecem antagonismo além de D2 para com os receptores serotoninérgicos (5HT), esta diferença estabelecida tem como objetivo a redução de sintomas comuns ao tratamento com fármacos típicos, dos quais os movimentos extrapiramidais e os níveis de prolactina encontram-se diminuídos e/ou controlados (BRUNTON; LAZO; PARKER, 2010).

2.2.1 Quetiapina: uso farmacêutico, farmacodinâmica e farmacocinética

A QUE (figura 1) é um derivado dibenzotiazepínico, antipsicótico atípico e atua como um antagonista nos receptores 5- hidroxitriptamina (5-HT1A, 5-HT2A, 5-HT7, 5-HT1B/D), D1, D2 e histamina (H1), bem como, em receptores adrenérgicos (α -1 e α -2). Assim, exerce seus efeitos farmacológicos pela interação com os sistemas dopaminérgico, serotoninérgico e noradrenérgico (SUTTAJIT et al., 2014).

Figura 1 – Estrutura química da quetiapina



Fonte: Adaptado de International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), 2020.

A QUE é rapidamente absorvida após a administração oral, chegando a sua concentração plasmática terapêutica, com média de tempo entre 1,5 a 2,0 horas. O fármaco liga-se a aproximadamente 83% de proteínas plasmáticas. Sua metabolização dá-se de forma hepática pelo Citocromo (CYP) P450 3A4 e, a partir de sua oxidação 11 metabólitos são formados, porém, apenas a norquetiapina é farmacologicamente ativa (DEVANE; NEMEROFF, 2001). Assim, as ações farmacológicas finais resultam da combinação com seu metabólito ativo: a norquetiapina. A norquetiapina exibe propriedades farmacológicas únicas, em comparação com a QUE, principalmente a inibição do transportador de noradrenalina (NAT) (*i.e.*, inibição da recaptação de noradrenalina), mas também antagonismo de 5-HT₇, 5-HT_{2C} e α -2 e ações agonistas parciais de 5-HT_{1A}. Isso pode explicar por que esse fármaco parece ser muito mais do que simplesmente um antipsicótico (STHAL, 2014).

Esses dois mecanismos podem, individualmente, aumentar a liberação tanto de dopamina quanto de noradrenalina. Juntos, os mecanismos parecem exercer ações sinérgicas em doses abaixo daquelas que produzem uma ocupação de 60% dos receptores D₂, necessários para as ações antipsicóticas. A QUE tem a capacidade de tratar simultaneamente os sintomas de insônia e de ansiedade, por meio de sua ação anti-histamínica e antagonismo dos receptores H₁. Dessa forma, ela é usada para tratar além da SCZ, transtornos bipolares, depressivos maiores e ansiedade geral (BRETT, 2015; HAWKINS; BUCKLIN; MUZYK, 2013).

O tempo de meia-vida é relativamente curto, podendo variar entre 3 a 6 horas, estando totalmente eliminada em 07 horas. A excreção do fármaco é de 73% na urina e 21% nas fezes. Os parâmetros farmacocinéticos são dependentes da relação tempo - dose (DEVANE; NEMEROFF, 2001).

A eficácia da QUE pode estar relacionada a um possível efeito anti-inflamatório, que poderia ser importante no tratamento de aspectos inflamatórios de transtornos psiquiátricos a nível de SNC (BAUNE; EYRE, 2010; JAEHNE et al., 2015; ZHORNITSKY et al., 2013). Estudos *in vitro* também corroboram com os efeitos anti-inflamatórios, porém há outros estudos que trazem o fármaco com potencial pró-inflamatório, o que leva a crer, que a ação farmacológica é dependente do estado inicial das células imunes frente a QUE (AL-AMIN; REZA, 2014; BIAN et al., 2008; MULLER et al., 2012).

2.2.2 Efeitos adversos da quetiapina

A utilização da QUE ganhou enfoque devido as suas distintas formas de apresentação relacionadas com dosagens e afinidades de receptores, além de pertencer à segunda geração e teoricamente não possuir tantos efeitos adversos como os de primeira, por isso, ela possui alta aplicabilidade para prática clínica. Porém, há tempos encontram-se relatos e constatações na literatura dos efeitos indesejáveis que ela é capaz de causar (BRUTON et al., 2010; JEON; KIM, 2017). Com risco moderado, uma gama de estudos volta-se para estes efeitos, principalmente os distúrbios metabólicos e alterações imunes.

Hirsch e colaboradores (2017) associam o diabetes *mellitus* tipo 2, com a terapia antipsicótica da QUE. Barton et al., (2019) consideram-a como fármaco associado ao ganho de peso rápido e assim, causando consequente risco cardiovascular e síndrome metabólica associada. Allaire et al., (2016) em sua pesquisa, associam o fármaco com o risco de obesidade mórbida, sendo que o mesmo leva ao quadro 2,5 vezes mais rápido do que em pacientes sem a terapia. Além disso, a QUE é associada à hiperelevação dos triglicérides, que leva a hipertrigliceridemia descompensada, que em casos raros pode desencadear uma pancreatite severa (FRANCO; VALLABHAJOSYULA; GRIFFIN, 2015).

O uso de antipsicótico é associado à morte prematura, tendo em vista que o ganho de peso pode levar à obesidade, que leva ao diabetes *mellitus* tipo 2 e o diabetes à doença cardíaca. Este risco metabólico seguido de todas as disfunções, já mencionadas, é explicado pelo bloqueio do receptor H1 e o receptor de serotonina 5HT_{2C}, integrantes do alvo farmacológico dos antipsicóticos (STHAL, 2014).

O seu efeito dual em nível de SNC e Sistema Nervoso Periférico (SNP) é relacionado com sua intensa atividade na pró-inflamação e com o seu efeito anti-inflamatório, o que de certo modo leva a alterações complexas no Sistema Imune. A literatura associa, a sua utilização com púrpura trombocitopênica trombótica (HUSNAIN et al., 2017), trombocitopenia (LUYKX et al., 2018), leucocitopenia (TOMITA et al., 2017) e mais gravemente a agranulocitose (GLOCKER; GROHMANN; SCHULZ, 2017), esta última podendo ser fatal.

2.2.3 Efeitos colaterais da quetiapina

Embora a QUE esteja relacionada com os mais diferentes efeitos adversos, ela é altamente eficaz nos transtornos a qual é prescrita, especialmente na psicose, além de outros efeitos (Quadro 2) que foram comprovados mais recentemente. Isso a caracteriza como um fármaco de alta complexidade que possui capacidade secundária devido à sua grande interação fármaco – receptor.

Quadro 2 - Efeitos secundários da quetiapina comprovados pela literatura.

Autor	Ano de publicação	Efeito	Modelo de estudo
Hardan; Jou; Handen	2005	Efeitos positivos em jovens com distúrbios generalizados do desenvolvimento.	<i>In vivo</i> Ensaio Clínico – Pacientes com distúrbios generalizados do desenvolvimento.
Grover et al	2009	Efeitos positivos no tratamento de distúrbios gastrointestinais funcionais refratários graves.	<i>In vivo</i> Ensaio Clínico – Pacientes com sintomas refratários do trato gastrointestinal.
Chen et al	2010	Efeito protetor no risco patológico pós – AVC.	<i>In vivo</i> Relato de caso.
Párraga et al	2010	Melhora significativa nos efeitos da Síndrome de Tourette.	<i>In vivo</i> Relatos de casos.
Nikiforuk	2012	Melhora da inflexibilidade cognitiva.	<i>In vivo</i> Animal – Ratos.
Han et al	2015	Redução na formação de EROs no tecido cerebral. convulsivas.	<i>In vivo</i> Animal – Ratos.

Quadro 2 – Efeitos secundários da quetiapina comprovados pela literatura
(conclusão)

Ma et al	2015	Diminuição do comprometimento cognitivo e menor suscetibilidade a crises	<i>In vivo</i> Animal- Ratos.
Heo et al	2017	Analgesia em dor óssea relacionada a câncer.	<i>In vivo</i> Animal- Ratos.
Vakilian et al	2017	Efeito modulador na expressão de citocinas pró/anti-inflamatórias em Alzheimer.	<i>In vivo</i> Ensaio Clínico – Portadores da Doença de Alzheimer.
Aytar et al	2018	Efeito modulador da dor após lesões traumáticas, da medula espinhal.	<i>In vivo</i> Animal – Ratas.
Pan et al	2018	Potencial benéfico na artrite induzida por colágeno através da supressão das vias de sinalização AKT e ERK.	<i>In vivo e In vitro</i> Animal – Camundongos; Celular – Macrófagos.
Robinson et al	2018	Capacidade protetora da barreira hematoencefálica em lesões cerebrais traumáticas.	<i>In vivo e In vitro</i> Animal – Camundongos; Celular - Células Endoteliais Microvasculares do Cérebro.
Carr et al	2019	Redução na secreção de cortisol e capacidade de preservar a aprendizagem reversa.	<i>In vivo</i> Animal – Ratos.

Fonte: Quadro elaborado pela autora.

2.3 TRANSTORNOS MENTAIS: INFLUÊNCIA DOS PROCESSOS OXIDATIVOS E INFLAMATÓRIOS

Na tentativa constante de compreender os processos que incluem as alterações em nível de SNC, e muitas vezes, SNP, surgem hipóteses para os mecanismos, e uma delas apresentada pelo estudo de Chiapponi e colaboradores (2016), onde o desequilíbrio das transmissões neuronais excitatórias e inibitórias pode ser responsável pelos transtornos mentais. Entretanto, a neuropatologia da SCZ é pouco compreendida, levantando outras pressuposições, dentre estas a oxidativa - inflamatória (SCHMITT et al., 2014).

Na última década, estudos envolvendo o entendimento fisiopatológico dos transtornos, sugeriram a total participação de células gliais e não somente de neurônios na SCZ (BERNSTEIN et al., 2014).

As células da glia são responsáveis por um importante papel de suporte e funcionamento do sistema nervoso, estando em número maior que os neurônios, porém em menor tamanho e espaço ocupado. As principais células da glia são os oligodentrócitos, as células de *Schwann*, os astrócitos, as células ependimárias e a micróglia nervosa (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). Assim, dentro das alterações nos transtornos psiquiátricos associados à funcionalidade glial, a inflamação tem importante destaque (HOWES; MCCUTCHEON, 2017). Por isso, especialmente as micróglias, astrócitos e neurônios acompanhados pelo conjunto que se define como um sistema imune periférico estão sendo implicados na modulação da inflamação, que como uma cascata de eventos está associada ao estresse oxidativo (LEZA et al., 2015).

Estados de estresse oxidativo podem desencadear inflamação crônica, e subsequentemente os transtornos psiquiátricos (HUSSAIN et al., 2016). Desse modo, cresce de forma exponencial o número de estudos que apontam para o sinergismo da inflamação acompanhada de estresse oxidativo, como crucial para patogênese de transtornos psiquiátricos (ALCOCER-GÓMEZ et al., 2014; FLESHNER; FRANK; MAIER, 2017; PASQUALI et al., 2018).

Devido às características fisiológicas e estruturais do cérebro, bem como, a uma alta taxa metabólica de suas células, esse órgão é particularmente suscetível ao estresse oxidativo. A interface entre estresse oxidativo e inflamação, parece estar

a cargo dos inflamassomas. Esses complexos de proteínas citosólicas são formados a partir do reconhecimento de agentes estressores patogênicos, ou não (MILLER; RAISON, 2016). Um estudo com ratos expostos a estresse crônico mostrou a ativação de produtos endógenos (do inglês, *Damage-associated molecular pattern (DAMPs)*) e do regulador da formação do inflamassoma (NLRP3) e aumento dos níveis de interleucina um beta (IL-1 β) no sangue e no cérebro. O bloqueio de NLRP3 nos ratos foi capaz de diminuir os níveis de IL-1 β nesses tecidos, além de reverter o comportamento depressivo (ZHANG et al., 2017).

2.4 METABOLISMO OXIDATIVO/ESTRESSE OXIDATIVO

O metabolismo oxidativo (Figura 2) é um processo que ocorre na mitocôndria, no qual a molécula de oxigênio (O₂) é utilizada para a produção de energia. O O₂ passa pela cadeia transportadora de elétrons gerando a Adenosina Trifosfato (ATP), ou seja, a energia metabólica (VITALE et al., 2013).

No metabolismo oxidativo, destaca-se um evento muito importante e estudado, o estresse oxidativo, que ocorre devido a um desequilíbrio entre a maior produção e/ou queda na neutralização das espécies reativas de oxigênio (EROs), pelos sistemas antioxidantes do organismo, levando a interrupção na sinalização redox ou à danos moleculares (SIES, 2015). Assim, quando a redução de O₂ é incompleta conseqüentemente há a formação de diferentes EROs, dentre elas o radical superóxido (O₂⁻) e o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), considerados as principais espécies causadoras de danos às células (VITALE et al., 2013). O H₂O₂ é capaz de gerar outros EROs, sendo o principal deles o radical hidroxila (OH⁻) que apresenta grande afinidade com a molécula de ácido desoxirribonucleico (DNA) que passa a sofrer os respectivos danos. Vale ressaltar que o organismo não possui defesas contra o OH⁻ (BARBISAN, 2014; PERL, 2013).

Esse desbalanço pode ocorrer pela exposição a fatores exógenos (estresse, infecções bacterianas e virais, alimentação baseada em gorduras e carboidratos, sedentarismo, poluição ambiental, radiação, etc.) ou endógenos que favorecem o desequilíbrio entre EROs e os níveis das defesas antioxidantes (ANDREAZZA et al., 2013; PERL, 2013).

Sies (2018) descreve que o estresse oxidativo pode ser classificado de acordo com a intensidade; as escalas de intensidade possuem variações, partindo

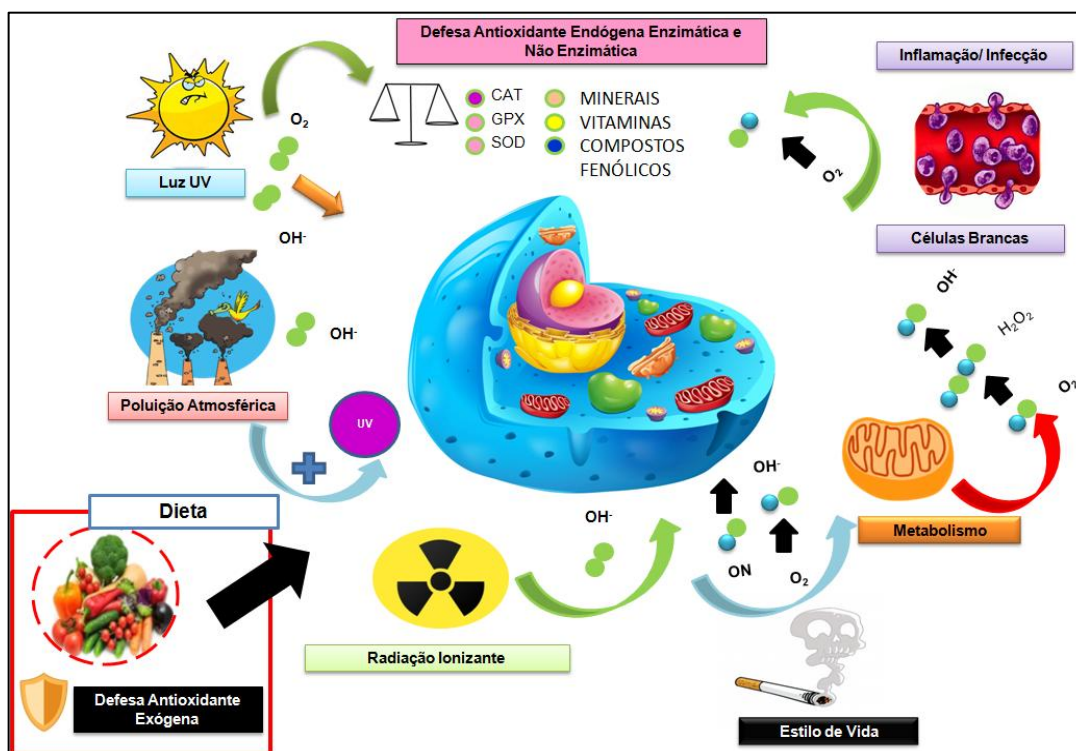
do estresse oxidativo fisiológico (*eustress*) até os níveis oxidativo tóxicos que danificam as biomoléculas (*distress*). A baixa exposição de células e organismos é necessária para a sinalização redox, abordando alvos específicos, considerando que a elevada exposição resulta em perturbações na sinalização redox e/ou danos em alvos não específicos.

Sendo as EROs moléculas com grande capacidade de causar danos a células, que pode se propagar aos tecidos e ao organismo como um todo, levando ao aparecimento de patologias distintas, sabe-se que com a evolução humana o organismo desenvolveu um sistema de defesa antioxidante endógeno, constituído por uma cadeia enzimática, composta pelas enzimas superóxido dismutase (SOD) (que atua dismutando o ânion radical superóxido em H_2O_2), Glutathione Peroxidase (GPX) (na mitocôndria) e Catalase (CAT) (no citosol) as quais detoxificam o H_2O_2 em água (H_2O) e O_2 . Há também o sistema antioxidante endógeno não enzimático, o qual forma-se através da dieta, em que sais minerais, vitaminas e compostos fenólicos são sintetizados, auxiliando no processo de equilíbrio (BARBOSA et al., 2010).

O nosso organismo além da proteção endógena alia-se com a proteção exógena, onde a alimentação rica em frutas, verduras e legumes permite a formação de moléculas bioativas com atividade antioxidante necessária ao processo homeostático do organismo (MONTAGNER, 2010).

O sistema protetor é inteiramente necessário ao organismo, já que uma vez ausente, os danos causados por essas moléculas são capazes de induzir a morte do organismo ainda no período fetal (SUTTON et al., 2003).

Figura 2 – Espécies reativas de oxigênio (EROs) e sistemas antioxidantes: metabolismo oxidativo



Fonte: A autora.

Legenda: Ao centro encontra-se a célula animal, em seu entorno alguns dos processos que levam a formação das Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), estando pela interferência no modo de vida. O metabolismo representado pela mitocôndria descreve o processo de interação entre o oxigênio (O_2) e seus produtos, que são os responsáveis pelos danos as células. Ainda destacam-se os sistemas de defesa antioxidante endógeno enzimático e não enzimático e o sistema exógeno, representado por alimentos consumidos em uma dieta saudável. A figura como um todo sintetiza o processo do metabolismo oxidativo.

Sabendo da grande importância que os processos oxidativos exercem sobre a homeostase dos sistemas, postula-se que com o tempo, essas mudanças possam levar a algumas das alterações estruturais e funcionais similares a aquelas vistas na psicose (BARRON et al., 2017). Para Fraguas e colaboradores (2017), a neuroinflamação conjunta ao estresse oxidativo pode levar a piores resultados em pacientes com primeiros episódios de psicose.

2.5 ASPECTOS FISIOLÓGICOS DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA

Os processos inflamatórios são respostas necessárias no organismo, por conta da defesa desencadeada por uma infecção ou injúria. As respostas inflamatórias - podendo ser locais ou sistêmicas -, objetivam eliminar agentes

estranhos responsáveis pelo desencadeamento dessas respostas, promovendo a reparação do tecido e por vezes, estabelecendo a memória imunológica (FULLERTON; GILROY, 2016).

Os macrófagos desempenham papel fundamental na regulação dos processos inflamatórios agudos e crônicos, por meio da secreção de diversas citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento (FULLERTON; GILROY, 2016). Estas células potencializam a ativação de linfócitos T e B pela expressão de moléculas co-estimuladoras, liberando assim, as citocinas pró - inflamatórias como a Interleucina 1 (IL-1), a Interleucina 6 (IL-6), a Interleucina 12 (IL-12) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF – α). Os macrófagos também são responsáveis pela síntese de alguns EROs (O_2 , OH, H_2O_2) e intermediários reativos do nitrogênio, cujo seu principal representante é o óxido nítrico (ON) (CRUVINEL et al., 2010).

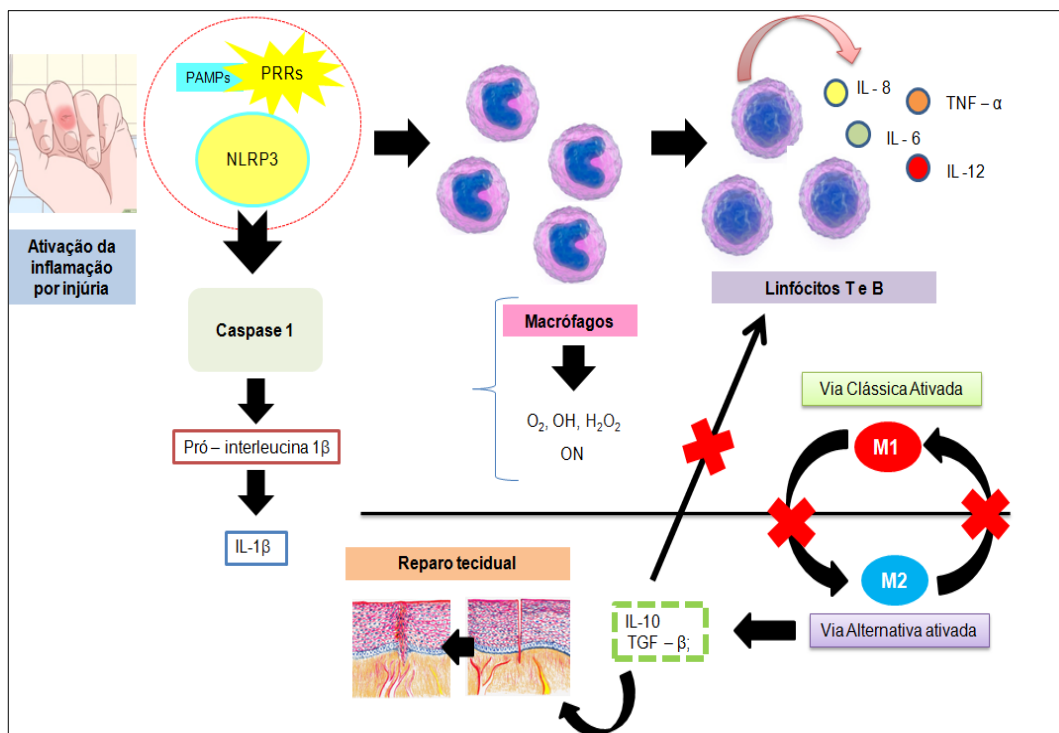
A rota inflamatória (Figura 3) inicia-se quando os receptores de reconhecimento de hospedeiros PRRs (do inglês, *Pattern Recognition Receptors*) são capazes de identificar segmentos moleculares conservados, os PAMPs (do inglês, *Pathogen Associated Molecular Pattern*). Alguns PRRs promovem a defesa do organismo via ativação de inflamossomas (LACKEY; OLEFDKY, 2015).

Os inflamossomas são complexos macromoleculares que se unem ao citoplasma e ativam a proteína caspase 1, sendo a mesma responsável pela ativação da resposta imune inata (CRUVINEL et al., 2010; FULLERTON; GILROY, 2016). A caspase 1 é responsável depois de ativada por desencadear o processo conhecido como piroptose, a clivagem proteolítica da pró – interleucina 1 β , que posteriormente leva a formação da IL-1 β madura, que por sua vez, induz o processo inflamatório pela síntese de macrófagos de outras citocinas, como a IL-6, IL-8, IL-12 e TNF- α (ROITT et al., 2014).

Com isso, é sabido e destaca-se que em inflamações agudas ocorre a ativação clássica da rota denominada de M1 e, em seguida ocorre à ativação da rota alternativa, denominada de M2. Logo, os macrófagos M1 são representativos da via clássica, exercendo atividades antiproliferativas e citotóxicas, sendo produto da secreção de ON, EROs e as citocinas pró- inflamatórias anteriormente mencionadas. Enquanto que, os macrófagos M2 representam a via alternativa com capacidade de inibir estas funções, ou ações executadas pelos macrófagos M1, que conseqüentemente realizam a secreção e produção de interleucinas anti-inflamatórias, como a Interleucina dez (IL-10) e o TGF – β ; (do inglês, *Transforming*

growth factor – beta), favorecendo o reparo tecidual, induzindo angiogênese, além de imunossuprimirem a atividade dos linfócitos T (BRUNE et al., 2013).

Figura 3 – Vias de ativação para a inflamação: clássica e alternativa



Fonte: A autora.

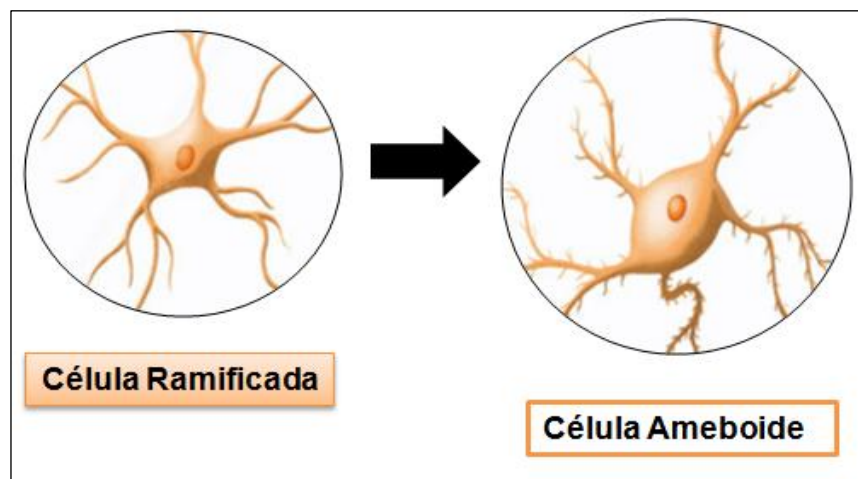
Legenda: O processo inflamatório inicia-se por uma injúria ou infecção, com isso, os PRRs (do inglês, *Pattern Recognition Receptors*) são capazes de identificar segmentos moleculares conservados, os PAMPs (do inglês, *Pathogen Associated Molecular Pattern*); Alguns PRRs promovem a defesa do organismo via ativação de inflamossomas (NLRP3), que são capazes de ativar a caspase 1, seguida pela ativação da pró- interleucina um beta (1β), que consequentemente ativa a interleucina um beta (IL -1β), que por meio dos macrófagos e linfócitos, leva a síntese de outras citocinas inflamatórias, assim, constitui-se a rota clássica (M1). Já a rota alternativa (M2), funciona como um processo de feedback negativo, em que os fatores anti- inflamatórios são liberados, promovendo a interrupção da atividade dos M1, levando ao reparo tecidual e suprimindo a atividade das interleucinas, complementando o processo inflamatório total.

Ainda, ressalta-se a importância dos granulócitos na constituição e auxílio das respostas, especialmente os neutrófilos; os neutrófilos são as células circulantes mais abundantes no organismo e desempenham funções importantíssimas no que corresponde o processo da resposta imune, por contribuírem além da eliminação de patógenos. Recentemente estudos revelaram mecanismos mais sofisticados associados às funções citotóxicas - neutrofílicas, e demonstraram que os neutrófilos contribuem para a defesa de várias doenças infecciosas e inflamatórias, agudas ou crônicas (WANG; ARASE, 2014), além de estarem

envolvidos na resposta adaptativa e não mais, somente na resposta imune inata (KUBES, 2018).

O SNC não diferentemente do SNP atua com o mesmo propósito na inflamação, no que compreende o conceito de neuroinflamação. Assim como os macrófagos residentes, as micróglias são as células “sentinelas” do SNC, sendo elas as primeiras a responderem a infecções ou lesões teciduais e desencadearem a resposta inflamatória. A sua ativação confere a elas uma alteração morfológica de uma célula ramificada para uma célula ameboide (Figura 4) (WOLF; BODDEKE; KETTENMANN, 2017).

Figura 4 – Célula da micróglia: morfologia



Legenda: Representação da célula da micróglia em seu estado não ativado (célula ramificada) e seu estado ativado (célula ameboide).

Fonte: A autora.

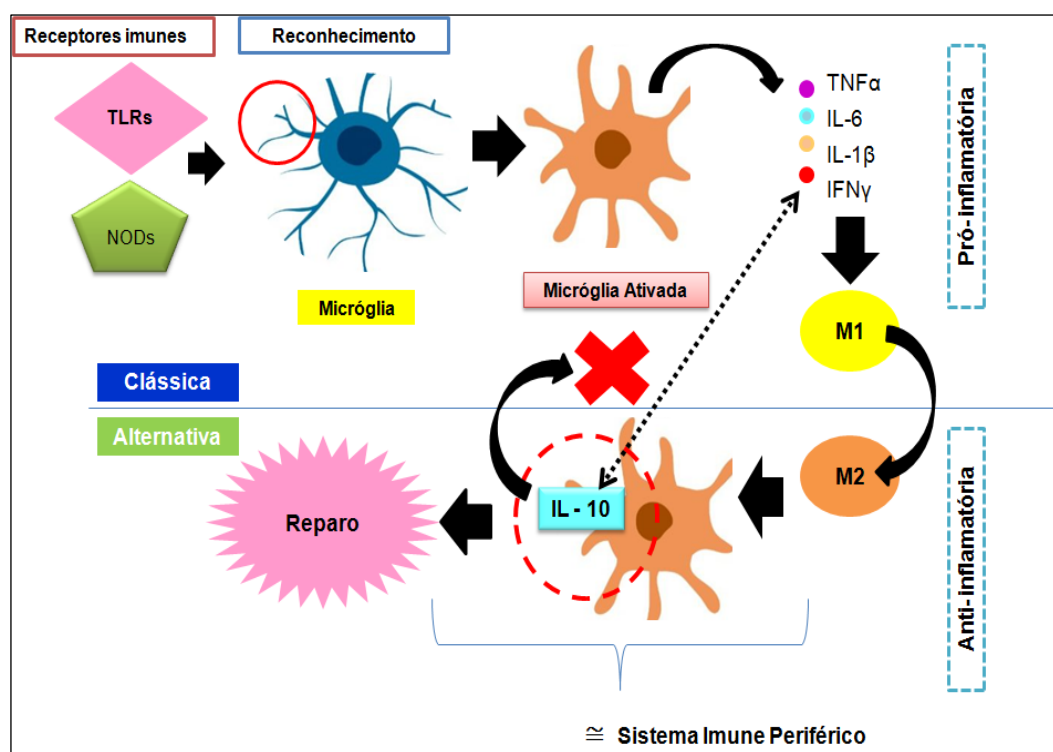
Os receptores imunes, como os do tipo toll-like (TLRs), domínios de oligomerização de ligação a nucleotídeos (NODs), receptores do tipo NOD e muitos receptores de eliminação, dão a elas a capacidade de reconhecer os estímulos prejudiciais e respondê-los produzindo citocinas inflamatórias como $TNF\alpha$, IL-6, IL- 1β , interferon- γ (IFN γ) e várias quimiocinas. Essa produção de citocinas foi denominada de estado M1 ativado classicamente, sendo seu estado pró – inflamatório (CHERRY; OLSCHOWKA; O'BANION, 2014).

Neste contexto, existe ainda o estado M2 relacionado ao reparo, podendo ser denominado de “rota alternativa” ou efeito anti-inflamatório; Vários autores trazem que a rota M2 das microglias apresenta-se de forma semelhante aos macrófagos no

SP (FENN et al ., 2012; FREILICH et al ., 2013; LIU et al ., 2012). Embora, para a microglia, o conceito de polarização M1 / M2 ainda é questionado (ORIHUELA; MCPHERSON; HARRY, 2016), hoje se sabe que a ativação microglial é um processo altamente dinâmico que pode ser bem diferente em diversas situações e processos patológicos (WOLF; BODDEKE; KETTENMANN, 2017).

Por isso, considera-se a inflamação como função importante e crucial para com os transtornos psiquiátricos, visto que a desregulação do sistema imune inato, seguido pela produção de citocinas inflamatórias, também pode tornar-se uma das consequências sintomáticas da psicose, ou uma das causadoras. Esse é um paradoxo, ainda a ser esclarecido (ROSENBLAT; MCINTYRE, 2016).

Figura 5 – Ativação microglial e desenvolvimento das rotas de inflamação



Fonte: A autora

Legenda: As vias de inflamação da micróglia apresentam-se de maneira semelhante ao sistema imune periférico, estando sua via clássica a micróglia ativada pelos receptores de reconhecimento, liberando assim, citocinas inflamatórias, necessárias ao processo da resposta inflamatória, já na rota alternativa, as micróglia liberam citocinas anti-inflamatórias, que tem a capacidade de imunossuprimirem os processos inflamatórios e assim, desenvolvem-se os reparos necessários, o que finaliza a etapa. Ressalta-se que as etapas são complementares.

Além disso, estudos com modelos animais de transtornos psicóticos, sugerem a ativação do sistema imune como o resultado de uma combinação de predisposição

genética e, um modelo de dois ataques imuno mediados: infecção, e estressores ambientais durante a gestação e o início da vida que ativam a micróglia, perturbam o desenvolvimento neuronal, estabelecendo, assim, um estágio de vulnerabilidade para distúrbios psicóticos posteriores, como é o caso da SCZ (BERGINK; GIBNEY; DREXHAGE, 2014; RADHAKRISHNAN; KASER; GULOKSUZ, 2017).

2.6 O PAPEL DOS NEUTRÓFILOS NO SISTEMA IMUNE INATO

A imunidade inata é conceituada devido a uma série de respostas rápidas e estereotipada por um grande número, embora limitado de estímulos. Ela compõe-se por barreiras físicas, químicas e biológicas, células especializadas e moléculas solúveis, independentemente de contato prévio com agentes patológicos ou imunógenos (CRUVINEL et al., 2010).

Dentre as células que a compõe, destacam-se os neutrófilos, que apresentam funções importantíssimas não somente na resposta imune inata, mas também na resposta adaptativa (JABLONSKA; GRANOT, 2017). Os neutrófilos são células altamente especializadas que representam a maior parte dos granulócitos em circulação no sangue humano (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2014), estando em torno de 50 a 70% de todos os leucócitos produzidos. Hematopoieticamente sua formação dá-se na medula óssea, seguida pela diferenciação do núcleo, até o seu estado de segmentação e maturação (KUBES, 2018).

Após sua maturação, a célula normalmente possui citocinas ativadoras como o TNF – α (sozinho ou combinado ao IFN – γ), IL-6, fator de crescimento de colônias de granulócitos (G-CSF) e o fator estimulador de colônia de macrófagos e granulócitos (GM-CSF) (VON VIETINGHOFF; LEY, 2008), tendo esta última a ação inibitória de morte apoptótica ao lado de TNF- α e Interleucina 8 (IL-8) (QUENTMEIER et al., 2003); Seu citoplasma é enriquecido por grânulos e vesículas secretoras (KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013).

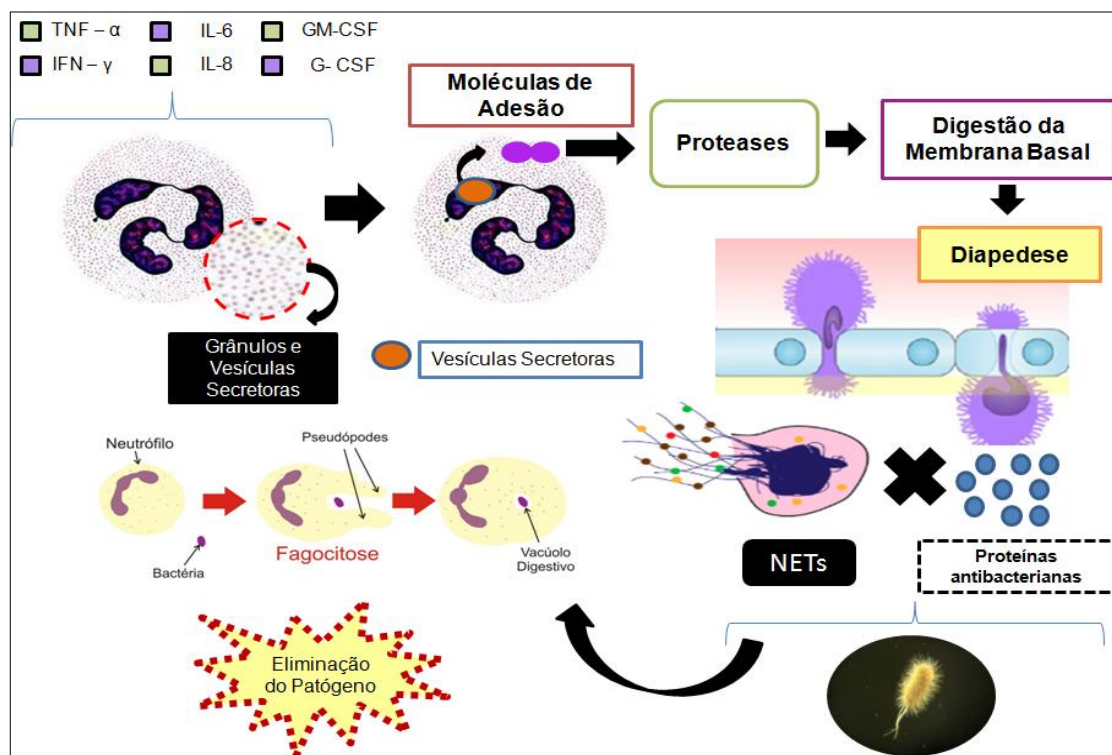
Os grânulos existentes nos neutrófilos possuem características únicas (as quais os diferem) e nomenclaturas distintas, assim: os grânulos específicos ou "secundários" são compostos de lactoferrina, catelicidina, fosfatase alcalina, colagenase (gelatinase), lisozima, proteínas básicas antibacterianas, não enzimáticas e lipocalina; os grânulos azurófilos ou "primários" são compostos de mieloperoxidase (MPO), proteína de aumento da permeabilidade/bactericida

(BPI), defensina, serina proteases, fosfatase ácida, α - Manosidase, arilsulfatase, β -galactosidase, β -glicosidase, catepsina G, 5'-nucleotidase, elastase, colagenase, MPO, lisozima e proteínas antibacterianas catiônicas. Por fim, e menos complexo têm-se os grânulos terciários compostos de catepsina (COWLAND; BORREGAARD, 2016).

As vesículas secretoras transportam inicialmente para a superfície dos neutrófilos as moléculas necessárias para a adesão e então, os grânulos de gelatinase fornecem proteases que podem digerir a membrana basal e / ou matriz extracelular, permitindo a diapedese de neutrófilos. Estas células eliminam patógenos que utilizam mecanismos dependentes de NADPH-oxigenase (EROs) ou proteínas antibacterianas (catepsinas, defensinas, lactoferrina e lisozima) (LIEW; KUBES, 2019).

As proteínas antibacterianas são liberadas dos grânulos de neutrófilos para os fagossomos ou para o meio extracelular, atuando assim, nos patógenos extracelulares. Neutrófilos altamente ativados podem eliminar microrganismos extracelulares liberando as NETs, impedindo-os de se espalhar, facilitando também, a fagocitose. O processo de fagocitose tem início pela ligação dos receptores de superfície do fagócito ao patógeno, o qual, então, é internalizado em fagossomos. No interior do fagócito, o fagossomo funde-se a lisossomos, cujo conteúdo é liberado com a digestão e a eliminação do patógeno (MANFREDI et al., 2018).

Figura 6 – Neutrófilos: processo de fagocitose



Fonte: A autora

Legenda: Os neutrófilos são células altamente especializadas que possuem em seu conteúdo uma série de quimiocinas e citocinas, contidas em grânulos e vesículas secretoras. Quando em contato com um patógeno, as vesículas secretoras levam até a superfície moléculas de adesão, que ativam as proteases, favorecendo o processo de digestão da membrana basal e consequentemente levando a diapedese. Na diapedese, os neutrófilos externalizam suas formas de fagocitose, estando por proteínas antibacterianas, ou pelas armadilhas extracelulares (NETs). A fagocitose ocorre normalmente, em que o patógeno é internalizado e posteriormente digerido e eliminado.

Nos processos inflamatórios, a condição de agudo ou crônico determina alterações fenotípicas destas células. Na inflamação aguda os neutrófilos passam para corrente sanguínea, ainda imaturos, tornando-se segmentados conforme o curso da patogênese, quando a inflamação ganha curso crônico, passa a apresentar a hipersegmentação, um estado além do processo de maturação. Assim, o processo de produção e ativação é controlado pelo fator estimulador de G-CSF, que é produzido como forma de resposta a interleucina dezessete A (IL-17A), sintetizada pelas células T. A liberação de IL-17A, por sua vez, está sob o controle da Interleucina vinte e três (IL-23), originária de macrófagos residentes em tecidos e células dendríticas (Li et al., 2018).

Por isso, nosso organismo ao entrar em contato com substâncias que reconhecidas como estranhas, apresentam o perfil inflamatório e/ou infeccioso, em

que os neutrófilos condicionam-se à neutrofilia, ou seja, a quantidade destas células mostra-se em elevação. No decorrer, as células passam por apoptose ou descongestionamento/ descolamento de sua cromatina, dissolvendo suas membranas nucleares e liberando a cromatina revestida com proteínas granulares, sendo então removidas por macrófagos e células dendríticas. Assim, ocorre um processo em que denominamos de regulação negativa, onde a síntese de IL-23 é reduzida e conseqüentemente o G-CSF também (KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013).

O tempo estimado de vida dos neutrófilos pode variar de acordo com a condição em que o indivíduo se encontra, estando em tempos maiores na circulação quando os mesmos apresentarem condições e situações patológicas. Há também um estado de neutropenia, comum em pacientes imunossuprimidos ou em tratamento farmacológico constante, que leva muitas vezes a descompensar o sistema imune e agravar a homeostase do organismo, daí a sua importância conjunta ao fato de ter sido cada vez mais estudado (RODRÍGUEZ-ESPINOSA et al., 2015).

2.7 A DESCOBERTA DAS ARMADILHAS EXTRACELULARES FORMADAS POR NEUTRÓFILOS (NETs)

Por muito tempo a descrição em relação à morte dos neutrófilos foi direcionada principalmente a apoptose ou necrose, e mais recentemente por necroptose (WANG; YOUSEFI; SIMON, 2018). Porém, ao passar dos anos estudos foram sugerindo outras formas originárias do processo. Em 1996, um novo paradigma fora introduzido, onde os neutrófilos não morreriam apenas por apoptose, foi quando Takei e seus colaboradores descreveram e relacionaram a morte desta célula com descongestionamento/ descolamento de sua cromatina, ao serem estimuladas por forbol 12-miristato 13-acetato (PMA), assim suas membranas nucleares eram dissolvidas, e a própria cromatina revestida com proteínas granulares era liberada, num processo denominado netose.

Em 2004, este achado se confirmou e fora entendido; a cromatina revestida que era liberada, passou a ser denominada de NETs, que aparentemente eram compostas por uma estrutura antibacteriana (BRINKMANN et al., 2004). O momento exato e como estas armadilhas eram liberadas levaram a diferentes conclusões:

inicialmente os relatos eram de que a célula liberava as NETs sem necessariamente morrer, e posteriormente os estudos direcionaram tal mecanismo apenas aos neutrófilos em estado apoptótico, entre 2 a 4 horas após a sua ativação, este conceito ainda é discutido e divergido por vários autores (DOUDA et al., 2014; DOUDA et al., 2015; KHAN; PALANIYAR, 2017).

Os mecanismos tornaram-se cada vez mais elucidados e assim, sabe-se que a formação das NETs independe de NADPH-oxidase (Nox) sendo facilitada pelo influxo de cálcio e EROs (FUCHS et al., 2007; PIETERSE et al., 2018; RAVINDRAN; KHAN; PALANIYAR, 2019), porém essa não é a única maneira das redes serem formadas. Até o momento foram descritas três maneiras de respostas e formação das NETs, onde os neutrófilos podem liberar DNA mitocondrial como armadilhas extracelulares (YOUSEFI et al., 2009), as redes dependentes de NOX e as NETs dependente da interação com o receptor do tipo *Toll* 4 (TLR4) da superfície plaquetária que responde ao Lipossacarídeo (LPS) na parede celular de bactérias gram-negativas (YIPP et al., 2012; YIPP; KUBES, 2013).

2.7.1 Papel das NETs na resposta inflamatória

As armadilhas e/ ou redes extracelulares formadas por neutrófilos apresentam grande relevância e impacto, no que diz respeito às respostas do organismo - especialmente a imunidade inata (GRANGER; DE CHAISEMARTIN; CHOLLET-MARTIN, 2014). Formada por uma estrutura única de DNA “decorada” de peptídeos antimicrobianos, ela tem sido relatada nas mais diferentes patologias que vão de doenças inflamatórias até neoplasias. As armadilhas formam-se logo após a hiperestimulação, estando os neutrófilos ainda vivos e por vezes mantendo-se vivos (RAVINDRAN; KHAN; PALANIYAR, 2019).

A formação de NETs durante as doenças inflamatórias agudas e/ou crônicas é provavelmente favorecida por tecidos pró-inflamatórios e citocinas sistêmicas. Assim, além das NETs regularem a função antimicrobiana, elas regulam a modulação direta ou indireta de citocinas inflamatórias e outras células imunes, através de estímulos e sinais (GRANGER; CHAISEMARTIN; CHOLLET-MARTIN, 2014).

A liberação das armadilhas na forma aguda ou na forma crônica ganha enfoque devido seu papel benéfico e maléfico, estando numa constante tentativa

homeostática para as respostas imunomediadas. Assim, respostas imediatas com a eliminação patogênica são facilmente conduzidas, enquanto que normalmente as doenças crônicas sofrem piora da sua fisiopatologia, devido a grande exposição dos componentes celulares dos neutrófilos, responsáveis pela extrusão das armadilhas; Elas também podem desempenhar papéis críticos durante doenças autoimunes (YANG et al., 2016) ou doenças estéreis (JORCH; KUBES, 2017).

Estas doenças inflamatórias são definidas como condições patológicas nas quais o sistema imunológico é intolerante aos autoantígenos, levando a mecanismos efetores, como autoanticorpos e linfócitos autorreativos. As NETs podem desempenhar papéis significativos na fase de iniciação de doenças autoimunes, expondo componentes endógenos intracelulares ao sistema imunológico, que exacerba a inflamação ou até resulta na produção de autoanticorpos (CASTANHEIRA; KUBES, 2019).

As “armadilhas” estão presentes em grande quantidade em sítios inflamatórios, atuando diretamente sobre os microrganismos e servindo também como barreira física que impede sua disseminação. Em condições normais, os neutrófilos são eliminados da circulação e dos tecidos inflamados por apoptose. A desregulação da produção e/ou da eliminação dessas estruturas desempenha uma função essencial na patogênese de doenças autoimunes e nos danos teciduais (ANDRADE; PENAFORTE; VELOSO, 2016).

2.7.2 Mecanismos de formação das NETs

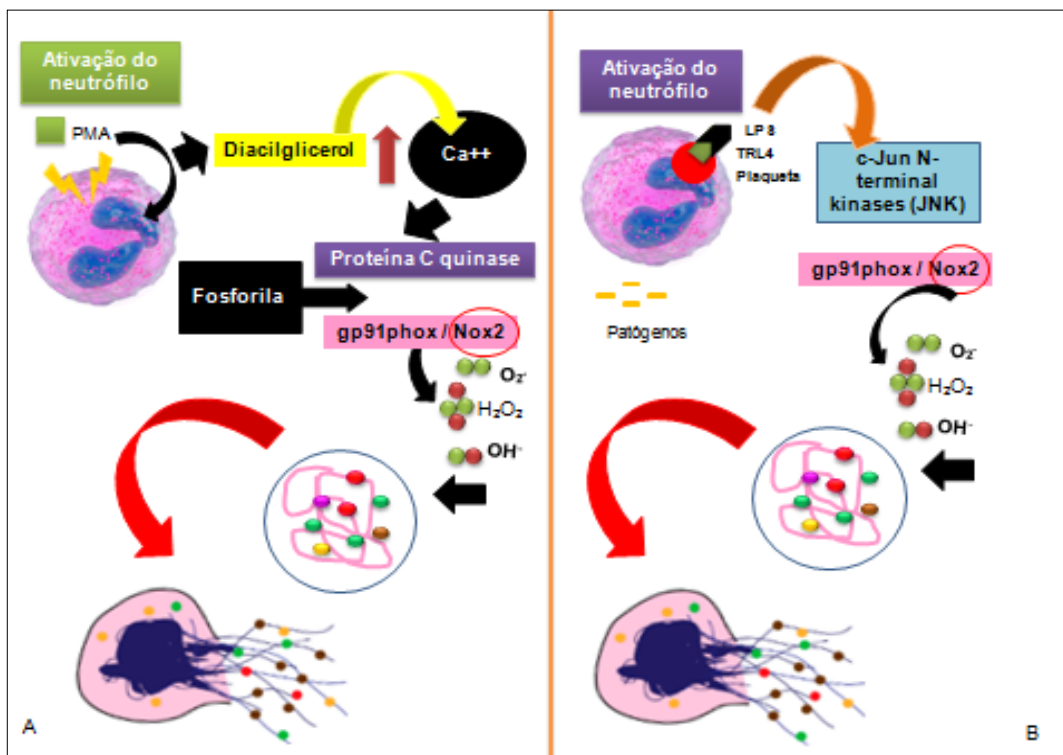
2.7.2.1 Formação NET dependente de Nox

Dos vários mecanismos existentes na formação de NETs, o dependente de Nox é o melhor descrito (CLARK et al., 2007), estando de duas maneiras (Figura 7A e Figura 7B): A primeira é descrita através da entrada do PMA que ativa o diacilglicerol, que é seguido por fontes de cálcio liberadas pelo retículo endoplasmático no citosol, aumentando conseqüentemente a atividade da proteína C quinase, que então fosforila gp91phox / Nox2 (KAPLAN; RADIC, 2012). Assim, esse processo facilita a atuação da enzima Nox, impulsionando a geração de EROs, que desintegra as membranas dos grânulos e do núcleo; Embora normalmente contidas nos grânulos azofílicos, a elastase de neutrófilos e a MPO ficam livres, interagindo

com o núcleo, onde podem clivar histonas e facilitar a desintegração da cromatina. Esse processo culmina na perda da integridade da membrana do neutrófilo e o DNA descondensado, que passa a ser “decorado” com conteúdo granular, sendo liberado no meio extracelular para desempenhar funções antimicrobianas (PAPAYANNOPOULOS et al., 2011).

A segunda via é ativada pela LPS – endotoxina liberada por bactérias gram-negativas – sendo sua atuação numa via separada mediada por c-Jun N-terminal kinases (JNK), esta proteína auxilia no processo de autodestruição celular. Seu mecanismo é semelhante ao PMA após a fosforilação de Nox, porém o processo inicial ocorre diferente, em que a ligação do LPS ao TLR4 na superfície dos neutrófilos, induz a formação de NETs dependentes de Nox (KHAN et al., 2017).

Figura 7 – Mecanismos de formação de NETs dependentes de NOX



Fonte: A autora

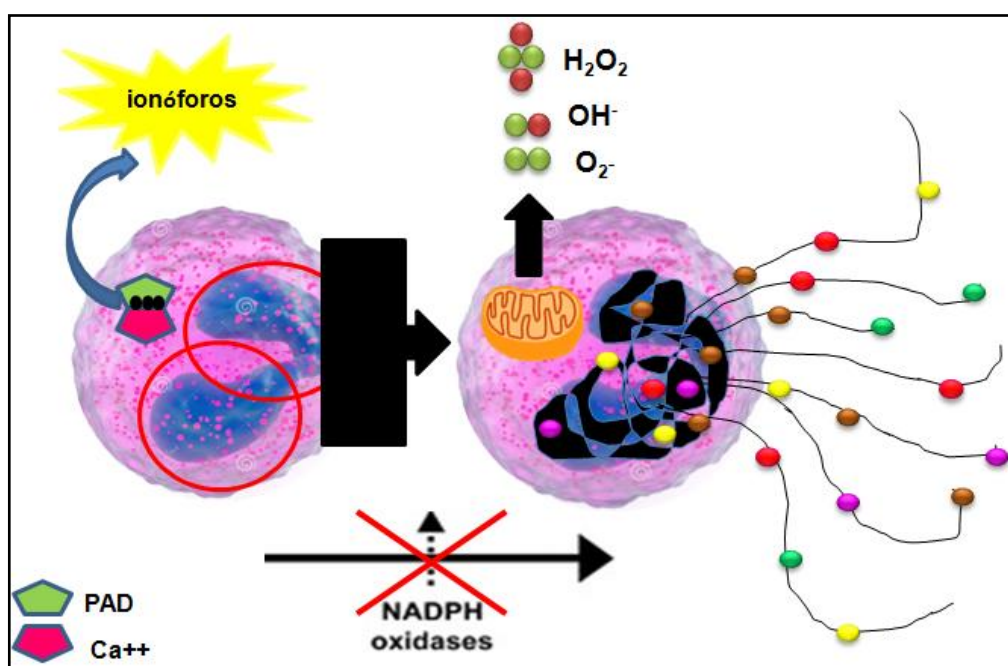
Legenda: Na figura 7A a entrada do Forbol Doze Miristato Treze Acetato (PMA) ativa o diacilglicerol, que é seguido por fontes de cálcio liberadas pelo retículo endoplasmático no citosol, o que consequentemente aumenta a atividade da proteína C quinase, que fosforila gp91phox / Nox2. Esse processo facilita a atuação da enzima Nox, impulsionando a geração de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), que desintegra as membranas dos grânulos e do núcleo; Com a perda da integridade da membrana do neutrófilo, o Ácido desoxirribonucleico (DNA) descondensado passa a ser “decorado” com conteúdo granular, sendo liberado no meio extracelular para desempenhar funções antimicrobianas. A segunda via (7B) é ativada pela Lipopolissacarídeo (LPS) sendo sua atuação mediada por c-Jun N-terminal kinases (JNK), esta proteína auxilia no processo de autodestruição celular. Seu mecanismo é semelhante ao PMA após a fosforilação de Nox, porém o processo inicial ocorre diferente, em que a ligação do LPS ao Receptor do tipo *Toll* quatro (TLR4) na superfície dos neutrófilos, induz a formação de NETs dependentes de Nox.

2.7.2.2 Formação NET independente de Nox

A formação de NETs independente de Nox (Figura 8) considera o grande papel de ionóforos de cálcio no processo (PARKER et al., 2012). É sabido que grandes quantidades de Proteínas Arginina Desiminases (PAD) - Principal carreadora de nitrogênio - estão presentes no citosol e, uma vez ligadas ao cálcio facilitado pelos ionóforos, translocam-se para o núcleo neutrofílico. Então, a enzima deimina os resíduos de histona - arginina carregando uma carga positiva na citrulina neutra o que permite a descondensação da cromatina, necessária para a formação

de NETs independente de Nox (WANG et al., 2009). Vale ressaltar que a citrulinação de promotores é de particular importância, pois fornece acesso a fatores de transcrição necessários para a formação de NETs (KHAN; PALANIYAR, 2017). Ainda, atribui-se às mitocôndrias nos neutrófilos, uma importante função, servindo como um gerador de EROs, facilitando a resposta imune inata através da formação de NETs independente de Nox (RAVINDRAN; KHAN; PALANIYAR, 2019).

Figura 8 – Mecanismo de formação de NETs independente de NOX



Fonte: A autora.

Legenda: Proteínas Arginina Desiminases (PAD) - Principal carreadora de nitrogênio - estão presentes no citosol e, uma vez ligadas ao cálcio facilitado pelos íonóforos, translocam-se para o núcleo neutrofilico. Essa enzima deimina os resíduos de histona - arginina carregando uma carga positiva na citrulina neutra o que permite a descondensação da cromatina, necessária para a formação de Armadilhas Extracelulares formadas por Neutrófilos (NETs) independente de Nox. As mitocôndrias nos neutrófilos geram Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) que facilitam a resposta imune inata através da formação de NETs independente de Nox.

2.7.2.3 O papel do disparo transcricional na formação de NETs

Embora o papel da transcrição na formação de NETs não esteja bem elucidado, acredita-se que ele é uma etapa importante na formação de NETs dependente ou independente de Nox. As regiões promotoras desempenham um papel na promoção da descondensação do DNA, sendo crucial na formação das redes. A formação de NETs pode ser suprimida pelo bloqueio da transcrição do

DNA, mas não pela tradução da informação proteica, e a inibição da transcrição não prejudica a geração de EROs para funções antimicrobianas comuns (KHAN; PALANIYAR, 2017).

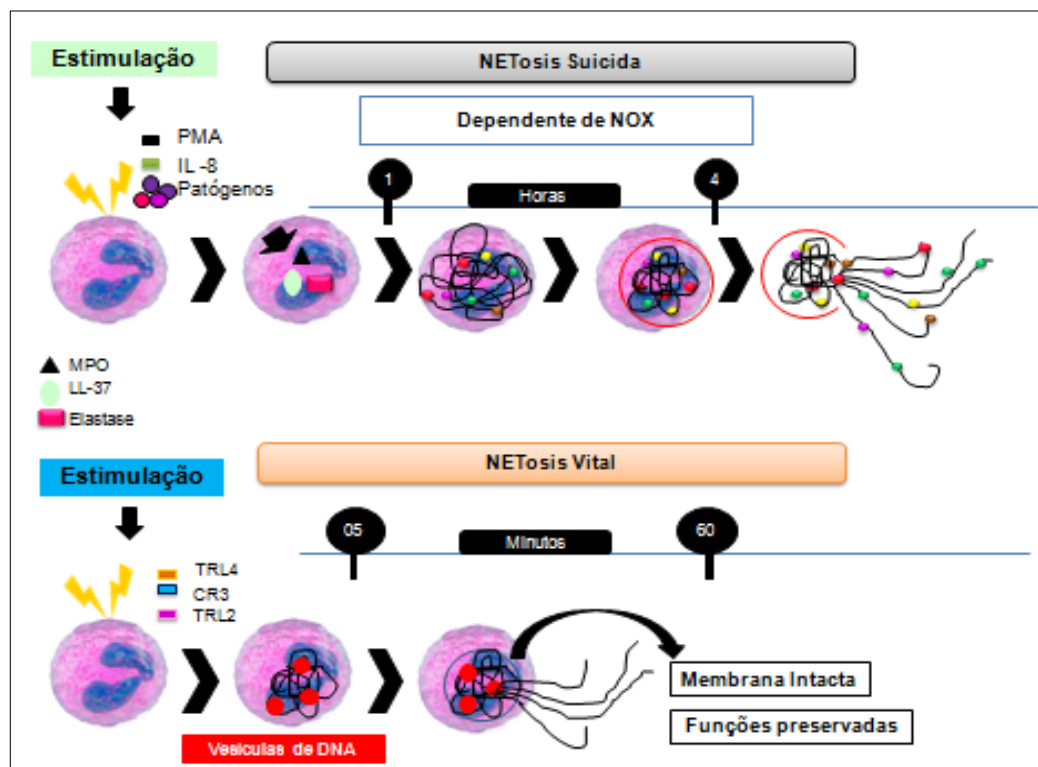
2.7.2.4 Formação: “NETosis vital e NETosis suicida”

Sabe-se que a NETosis (também denominadas NEToses), apresentam-se de maneira distinta das outras mortes celulares conhecidas (necrose, apoptose, morte celular induzida por fagocitose, piroptose, fagoptose e lise celular). Para tanto esse processo pode omitir as funções defensivas convencionais, como é o caso da quimiotaxia, por exemplo (YIPP; KUBES, 2013). Desde então, busca-se o entendimento da morte celular programada ou não, para isso autores introduziram o conceito de NETosis “vital” e “suicida” (Figura 9), no que confere o processo das armadilhas extracelulares de neutrófilos.

A NETosis "suicida" começa após uma estimulação, podendo ser por PMA, IL-8 ou vários patógenos microbianos em uma matéria dependente de Nox que leva à liberação de NETs dentro de 1 a 4 horas. A translocação de MPO, elastase e de peptídeo antimicrobiano LL-37 para o núcleo, favorece a descondensação nuclear e a ruptura da membrana nuclear. Posteriormente, o conteúdo do núcleo se mistura com as proteínas granulares e citosólicas. Finalmente, as rupturas da membrana externa e as NETs são liberadas pelos neutrófilos ativados no espaço extracelular (DE BUHR; VON KÖCKRITZ-BLICKWEDE, 2016).

A NETosis "vital" foi descrita como uma liberação rápida de NETs (05-60 minutos). Podendo ser induzida por uma ativação plaquetária mediada por TLR4 e sua interação com a integrina α L, cadeia ALFA-1 (CD11a) em neutrófilos. Além disso, uma ativação via receptor 3 do complemento (CR3) e receptor do tipo *Toll* 2 (TLR2) também foi demonstrada na presença de bactérias gram-positivas. O núcleo torna-se arredondado e descondensado. Vesículas com DNA nuclear são formadas e NETs são liberadas por brotamento nuclear (DE BUHR; VON KÖCKRITZ-BLICKWEDE, 2016). A membrana externa permanece intacta após a liberação das NETs e o neutrófilo nuclear mantém a capacidade de realizar várias tarefas, como a função antimicrobiana (YIPP; KUBES, 2013).

Figura 9 – Mecanismos de formação de NETosis suicida e NETosis vital



Fonte: A autora

Legenda: A NETosis "suicida" inicia-se após uma estimulação, podendo ser por Forbol Doze Miristato Treze Acetato (PMA), interleucina oito (IL-8) ou vários patógenos microbianos que levam à liberação de Armadilhas Extracelulares formadas por Neutrófilos (NETs) dentro de 1 a 4 horas, dependente de Nox. A Mieloperoxidase (MPO), elastase e o peptídeo antimicrobiano (LL-37) são translocado para o núcleo, favorecendo a descondensação nuclear e a ruptura da membrana nuclear, assim o conteúdo do núcleo se mistura com as proteínas granulares e citosólicas. Logo, as rupturas da membrana externa e as NETs são liberadas no espaço extracelular. A NETosis "vital" possui liberação rápida de NETs (05-60 minutos), induzidas por uma ativação plaquetária mediada pelo Receptor do tipo *Toll* quatro (TLR4) e sua interação com a integrina α L, cadeia ALFA-1 (CD11a) em neutrófilos. Além disso, uma ativação via receptor 3 do complemento (CR3) e Receptor do tipo do *Toll* dois (TLR2) também foi demonstrada na presença de bactérias gram-positivas. O núcleo torna-se arredondado e descondensado. Vesículas com Ácido Desoxirribonucléico (DNA) nuclear são formadas e NETs são liberadas por brotamento nuclear. A membrana externa permanece intacta após a liberação das NETs e o neutrófilo nuclear mantém-se com as funções preservadas.

2.7.3 Contextos fisiológicos da formação das NETS

A formação das armadilhas extracelulares é um processo que se altera, estando dependente do contexto homeostático, a exemplo disso cita-se a corrente sanguínea ou o tecido em condições alcalinas e hipertônicas. Na corrente sanguínea, a formação de NETs induzida por LPS ocorre em menos de 1 hora através de um processo vital, dependente de plaquetas e independente de Nox. A

formação de NETs induzida por LPS nos tecidos periféricos ocorre de 2 a 4 horas e, é um processo suicida dependente de Nox. Isso indica que os neutrófilos podem responder seletivamente aos sorotipos de LPS, dependendo do contexto. Essas discrepâncias ajudam a explicar como a resposta de NETs é capaz de montar simultaneamente uma resposta vigorosa a infecções intravasculares com risco de vida, evitando uma resposta excessivamente zelosa a uma infecção tecidual potencialmente mais gerenciável, impedindo danos desnecessários ao hospedeiro (PIETERSE et al., 2016).

A formação de NETs é promovida por um potencial hidrogênionico (pH) mais alcalino. Com o aumento do pH ambiental, ocorre um aumento significativamente maior no pH intracelular, e com isso forma-se os elementos necessários para o desenvolvimento das NETs: o cálcio intracelular, EROs mitocondrial e a citrulinação mediada pela proteína arginina deiminase quatro (PAD4) de histonas cruciais para a descondensação da cromatina e a externalização das redes (NAFFAH et al., 2017), ou seja, a produção de EROs a pH mais baixo tem sido implicada como uma causa potencial da supressão de NETs (BEHNEN et al., 2017). Essas constatações têm implicações na resposta do hospedeiro à infecção bacteriana durante a cicatrização de feridas crônicas, pois elas também possuem um pH alcalino (JONES; COCHRANE; PERCIVAL, 2015).

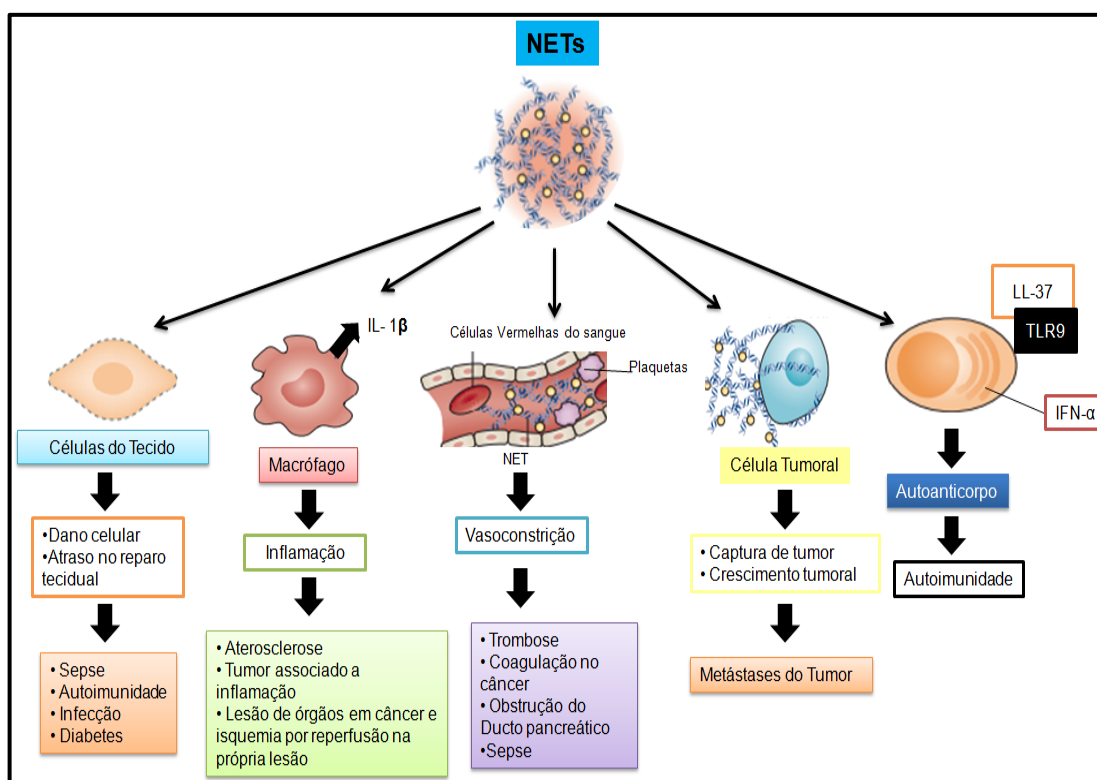
2.7.4 O papel das NETS nas doenças crônicas não transmissíveis (DCNTs)

As doenças crônicas não transmissíveis (DCNTs) são patologias multifatoriais majoritariamente associadas aos modos de vida, que permanecem por anos. Globalmente, elas representam as principais causas de mortalidade, e a maior ameaça ao desenvolvimento econômico e à saúde humana (MARRERO; ADASHI, 2015). As que mais acometem a população são as doenças do aparelho circulatório, neoplasias malignas, diabetes *mellitus*, doenças respiratórias e mais recentemente transtornos psiquiátricos (BRASIL, 2018). Os últimos, em 2015, no Brasil, representavam 51,6% do total de óbitos na população entre 30 a 69 anos (BRASIL, 2015).

Ao passo que os transtornos psiquiátricos utilizam um gatilho silencioso, surge a relevância para com a inflamação estéril, estando envolvida de forma crônica, independentemente de um agente infeccioso para o desenvolvimento da

“cascata” da fisiopatologia da doença. Assim, muitas dessas doenças têm sido associadas com a formação das NETs. A capacidade das NETs de danificar tecidos está bem documentada em infecções e doenças estéreis, além da alta relação na potencialização e indução de patologias, como: Imunodeficiência e doenças autoimunes, diabetes e doenças cardiovasculares, câncer, dentre outras (Figura 10) (PAPAYANNOPOULOS, 2017).

Figura 10 - Mecanismos de patologia induzidas ou mediadas por NETs



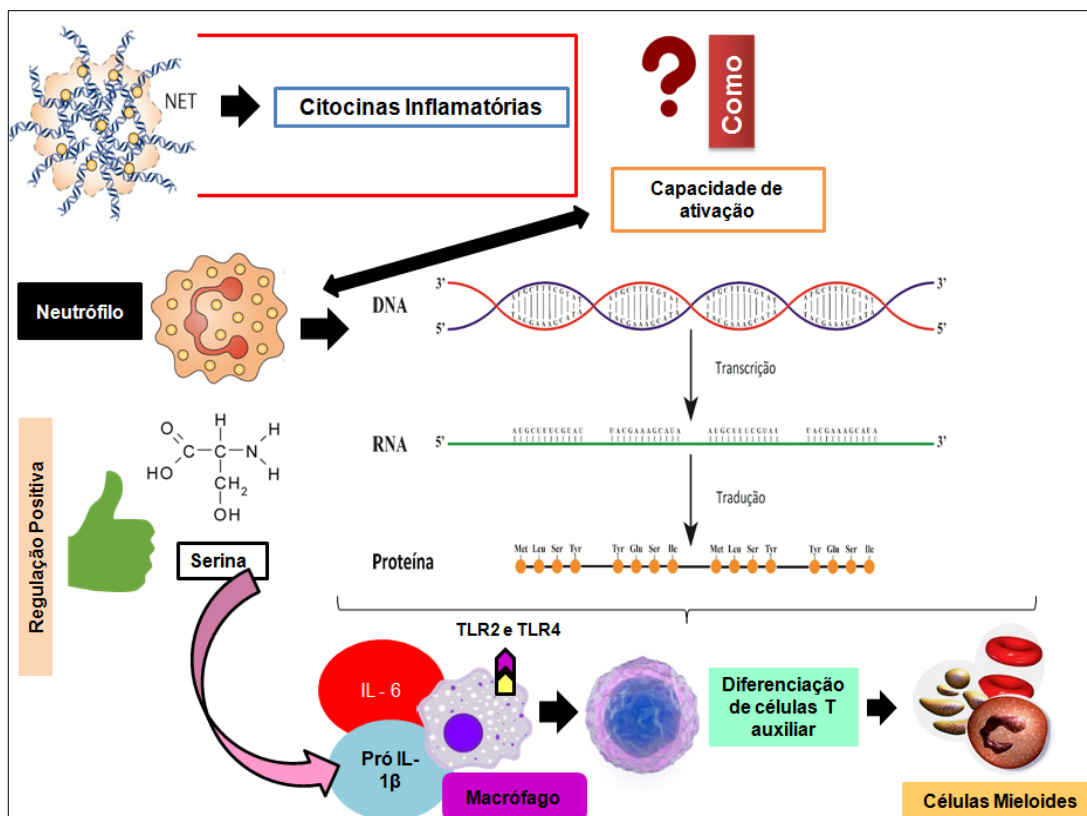
Fonte: Adaptado de PAPAYANNOPOULOS, 2017.

Legenda: Ao centro esta representada a estrutura física das armadilhas extracelulares (NETs), ao seu entorno as formas de interferências e processos patológicos induzidos pela sua formação exacerbada, nas condições do sistema imune inato e nas relações com o organismo.

Assim, as NETs estão envolvidas na modulação inflamatória, possuindo a capacidade de regular as citocinas inflamatórias de forma direta ou indireta; Uma das formas da modulação (Figura 11) em que os neutrófilos tem a capacidade de interferir é a ativação da transcrição gênica, que codificam IL-6 e pró IL-1 β em macrófagos, predominantemente via receptor TLR2 e TLR4. A regulação positiva dessas citocinas aumenta a diferenciação de células T auxiliar e o recrutamento de

células mieloides. As serina proteases dos neutrófilos também são conhecidas por processar pró IL-1 β em sua forma ativa (WARNATSCH et al., 2015).

Figura 11 – NETs: modulação inflamatória.



Fonte: A autora.

Legenda: As armadilhas extracelulares formadas por neutrófilos (NETs) possuem a capacidade de modular a rota inflamatória, através da ativação de citocinas. Os neutrófilos interferem realizando a ativação da transcrição gênica para a codificação de interleucina 6 (IL-6), e também, são conhecidos por sintetizarem na forma ativa a pró-interleucina um beta (1 β), devido a sua composição granulocítica formada por serina. Essas interleucinas ativadas levam a diferenciação de células T auxiliares e o recrutamento de células mieloides, ambas necessárias ao processo inflamatório por completo.

Nas doenças imunológicas, que variam de imunodeficiências a condições autoimunes, a capacidade fagocítica é alterada. É o caso da Doença Granulomatosa Crônica (DGC) em que a deficiência herdada de Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADPH) oxidase, compromete a fagocitose e a formação de NETs dependente de Nox (URBAN et al., 2006; ARNOLD; HEIMALL, 2017). Assim, os pacientes tornam-se vulneráveis à aspergilose, uma das principais causas de mortalidade nessa população (BIANCHI et al., 2009). Por outro lado, na Artrite Reumatóide (AR) foi demonstrado que os pacientes apresentaram produção

espontânea de NETs significativamente maior em comparação aos controles, bem como níveis elevados de ROS, NE, MPO e translocação nuclear de PAD4 (SUR et al., 2014). Além disso, os complexos MPO-DNA, que foram identificados como restos de utilidade investigativa da NETs, são encontrados em níveis mais altos em pacientes com AR em comparação aos controles e, estão associados ao aumento da formação e positividade de NETs para o fator reumatoide (KHANDPUR et al., 2013).

No Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) os neutrófilos com densidade normal produzem NETs em resposta ao soro desses pacientes ou anticorpos antiribonucleoproteínas, purificados de uma maneira que exige a iniciação por interferons do tipo I (IFNs – I), estando dependente das EROs. Consistentemente, a expressão gênica é orientada por IFNs - I, sendo a principal característica dos neutrófilos do LES. O *feedback* entre NETs e IFNs fornece um modelo para explicar como as NETs exacerbam as doenças autoimunes. A oxidação do DNA é uma modificação importante nas redes, que potencializa a indução e autoimunidade de IFNs com uma surpreendente especificidade em relação à fonte do DNA e EROs (GARCIA-ROMO et al., 2011; LOOD et al., 2016).

No diabetes, as úlceras nos pés estão entre as complicações mais incapacitantes e mortais, estas lesões favorecem a infiltração de neutrófilos; assim, o achado de que PAD4 e histonas citrulinadas estão elevadas nessas feridas é de significativa relevância clínica. NE, histonas e outros componentes das NETs foram encontrados em níveis elevados no sangue de pacientes diabéticos, NE particularmente predizendo atraso na cicatrização. Dado que a fase aguda da inflamação suprime o reparo tecidual, a capacidade das NETs de promover inflamação e destruição tecidual podem explicar sua capacidade de retardar a cicatrização dessas lesões, nesses pacientes. A glicose é necessária para NETosis, e neutrófilos de pacientes com diabetes liberam NETs mais prontamente – isto explica-se pelo aumento nas EROs causado pelos efeitos da glicose elevada na NADPH oxidase e nas mitocôndrias – (FADINI et al., 2016; WONG et al., 2015).

Outro mecanismo proposto através do qual as NETs promovem a inflamação, é a regulação positiva da produção de interleucina dois – um beta (IL- 2 β) por macrófagos, bem com, a ativação indireta das células TH17 (WARNATSCH; IOANNOU; WAN, 2015). De fato, biomarcadores indicando a presença de formação

de NETs mostraram uma associação independente com aterosclerose dos vasos coronários e doença arterial coronariana grave (BORISSOFF et al., 2013).

Sabendo que as DCNTs representam em números uma das maiores causas de mortes e tendo conhecimento de que o nosso organismo possui seus sistemas interligados, a imunidade e a inflamação ganham enfoque em suas funções complexas, de tal modo que há pouco tempo, parcelas de seus componentes estão sendo estudados e elucidados. Estes componentes possivelmente representarão novos alvos terapêuticos e possibilitarão maior qualidade de vida a esses pacientes, visto que o mecanismo das NETs possui forte envolvimento com o metabolismo oxidativo que inclui além de estilo de vida, a utilização farmacológica (APEL; ZYCHLINSKY; KENNY, 2018).

2.8 ANTIPSICÓTICOS COMO MODULADORES DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA

2.8.1 Efeito de psicofármacos na resposta inflamatória periférica

Os psicofármacos são fármacos que possuem certo grau de dificuldade de entendimento em relação ao seu mecanismo de ação, compreendidos pelas possíveis e distintas interações com os receptores- alvos e os tidos como “receptores- secundários”, os quais não integram o alvo terapêutico. Alguns efeitos, embora secundários, têm sido estudado, na tentativa de melhorar a terapia e a adesão do tratamento por parte dos pacientes, já que muitos deles apresentam em grande número efeitos colaterais e/ou reações adversas (STHAL, 2014).

Nesse contexto, a relação da modulação na inflamação vem sendo cada vez mais estudada, sendo que muitos psicofármacos apresentam efeitos anti-inflamatórios benéficos e outros não, considerando a capacidade dual que alguns princípios ativos desencadeiam por suas interações farmacocinéticas e farmacodinâmicas (STHAL, 2014). A exemplo disso têm-s o Lítio (Li) que apresenta ação anti-inflamatória isolada no sistema nervoso, sendo benéfica ao organismo, através da inibição da enzima glicogênio sintase quinase três (GSK-3) (BARBISAN, 2017), enquanto que a Ziprasidona (ZIP) e a Olanzapina (OZP), além da QUE mostram-se em tese com possíveis efeitos duais, estando na forma anti-inflamatória no SNC e no SNP apresentando-se, com efeito, pró-inflamatório (FERNANDES et al., 2019; DUARTE et al., 2019). Essa ação contraditória é postulada como a causa

das inúmeras alterações na via metabólica e responsável pelos efeitos colaterais e as reações adversas (OLTEN; BLOCH, 2018).

2.8.2 Efeito de psicofármacos na modulação das NETs

Que os psicofármacos tem potencial modulador nas repostas inflamatórias e interação com o sistema nervoso é sabido, além de novas abordagens os associarem com o desenvolvimento da autoimunidade induzida por medicamentos (AIM) ou ainda, por desempenharem pontuais alterações nas vias clássicas da metabolização - este último causado pelos conceituais antipsicóticos. As características clínicas da AIM incluem doença de órgãos multissistêmicos associada à produção de vários autoanticorpos, especialmente aqueles que fazem parte da constituição dos neutrófilos: os anticorpos antinucleares e anticorpos citoplasmáticos antineutrófilos (ANCA) (XIAO; CHANG, 2014).

O efeito dos psicofármacos na modulação das NETs é pouco estudado, estando até o momento da elaboração desta dissertação na literatura científica descrito apenas um estudo, em que estima-se a capacidade de inibição ou formação das redes. Irizarry-Caro e colaboradores (2018) avaliaram a atividade de vários fármacos, porém como psicofármaco apenas a atividade da Clozapina – que é um antipsicótico-. Assim, o fármaco fora estimulado em contato com os neutrófilos humanos por 04 horas, não demonstrando potencial efeito de indução ou aumento da capacidade de formação das NETs, nem prejudicando a degradação das mesmas. Como estes dados são escassos, não se pode definir a atividade psicofarmacológica sob as condições imuno-inflamatórias, especialmente as formadas pelo sistema macrófago - neutrófilo, logo, ocorre à necessidade de um melhor entendimento através de novos estudos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 DELINEAMENTO METODOLÓGICO GERAL

A metodologia empregada neste estudo está descrita sob a forma de um manuscrito, o qual foi submetido para a revista *Psychopharmacology*, fator de impacto 3.42, classificada pelo Capes- Periódicos como A2.

A seguir, é apresentado o delineamento metodológico geral do estudo: Com o objetivo de avaliar os eventos inflamatórios, proliferativos e citotóxicos da nmQUE, foram realizados experimentos celulares, utilizando a linhagem celular comercial de macrófagos (RAW 264.7) obtidos da *American Type Culture Collection* (ATCC[®], Manassas, VA, USA), leucócitos e neutrófilos, obtidos através de coleta sanguínea de voluntários – regulamentados pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) sob o n° 23,081.015838 / 2011/10. As células foram cultivadas separadamente em meio *Dulbecco's modified eagle medium* (DMEM), suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal (SBF), 1% de antibióticos penicilina/ estreptomicina e 1% do antifúngico anfotericina B.

Os macrófagos foram mantidos em incubadora de cultivo celular a 37°C e saturação de 5% de dióxido de carbono (CO₂), até a obtenção da concentração de 1x10⁵ cél/mL. Os macrófagos, leucócitos e neutrófilos foram tratados e ativados ou não com o agente PHA. A PHA foi descoberta por Peter C. Nowell (1960) quando demonstrou que esta lectina do feijão vermelho (*Phaseolus vulgaris*), era capaz de estimular linfócitos a sofrer mitose. Hoje a PHA é um método reconhecido e aceito de ativação pró-inflamatória de células imunes (GANESAN; XU, 2017).

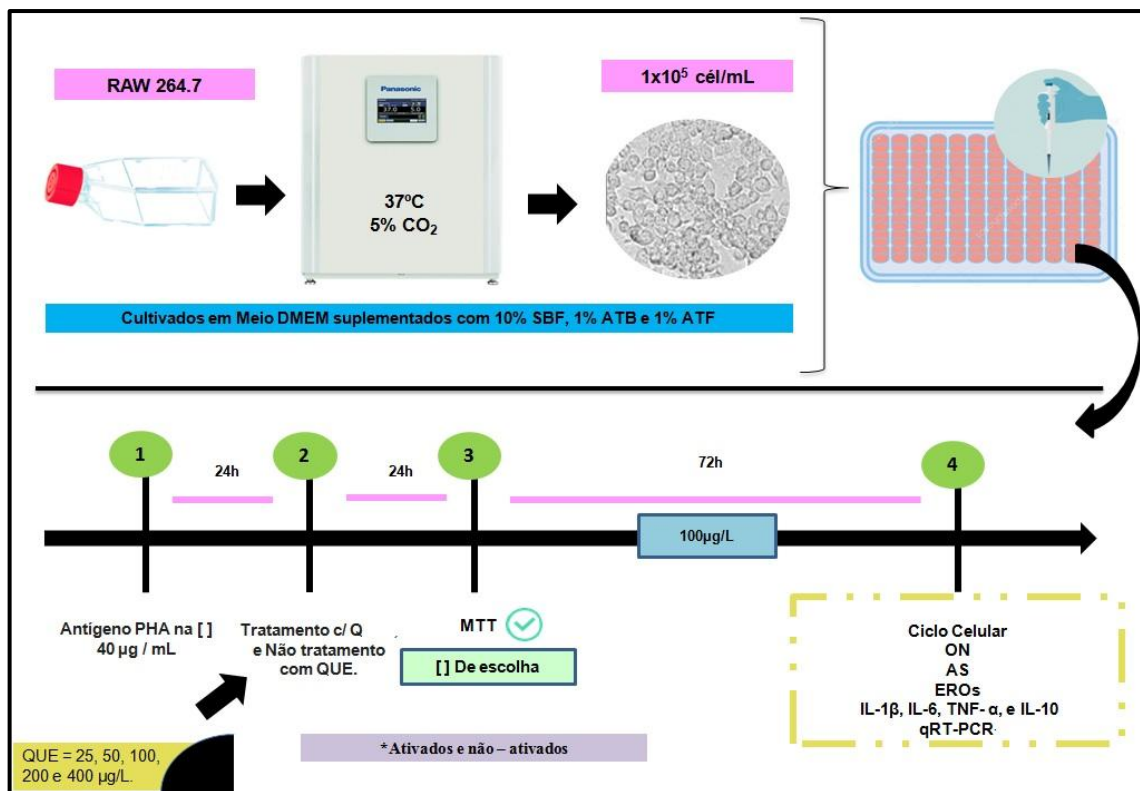
Após 24 horas, foram tratados com diferentes concentrações da QUE (25, 50, 100, 200 e 400 µg/L). Dada as 24 horas do tratamento, foi avaliada a viabilidade celular de todas as células, através do ensaio espectrofotométrico do Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT). Com o resultado destes testes, foi definida a concentração de escolha da QUE para ser utilizada nas análises seguintes: 100 µg/L.

Avaliou-se então, após 72 horas de tratamento com a concentração de escolha, a proliferação celular, moléculas oxidativas e a expressão proteica e gênica (via *Quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction* (qRT-PCR) de citocinas pró- inflamatórias (IL-1, IL-6, TNF-α) e anti-inflamatórias (IL-10) em RAW

264.7. Ainda, a fim de avaliar o efeito da nmQUE na formação de NETs, os neutrófilos foram, previamente ativados ou não pela exposição a células de leveduras por 2 horas, seguidos da exposição a concentração de escolha de QUE por mais 2 horas, estando posteriormente fixados e corados, seguidos pela captura das imagens e avaliação condizente.

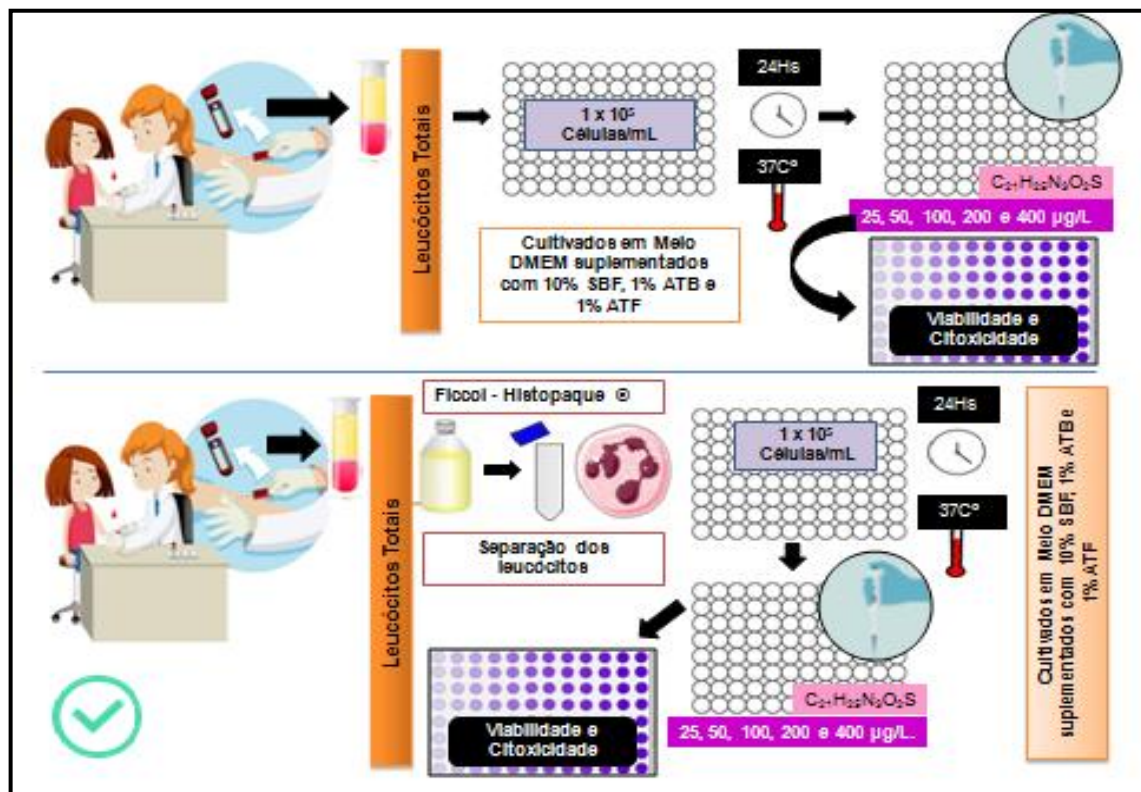
Abaixo, as figura 12, 13 e 14, que resumem a metodologia utilizada neste trabalho.

Figura 12 – Delineamento metodológico geral das análises realizadas com macrófagos



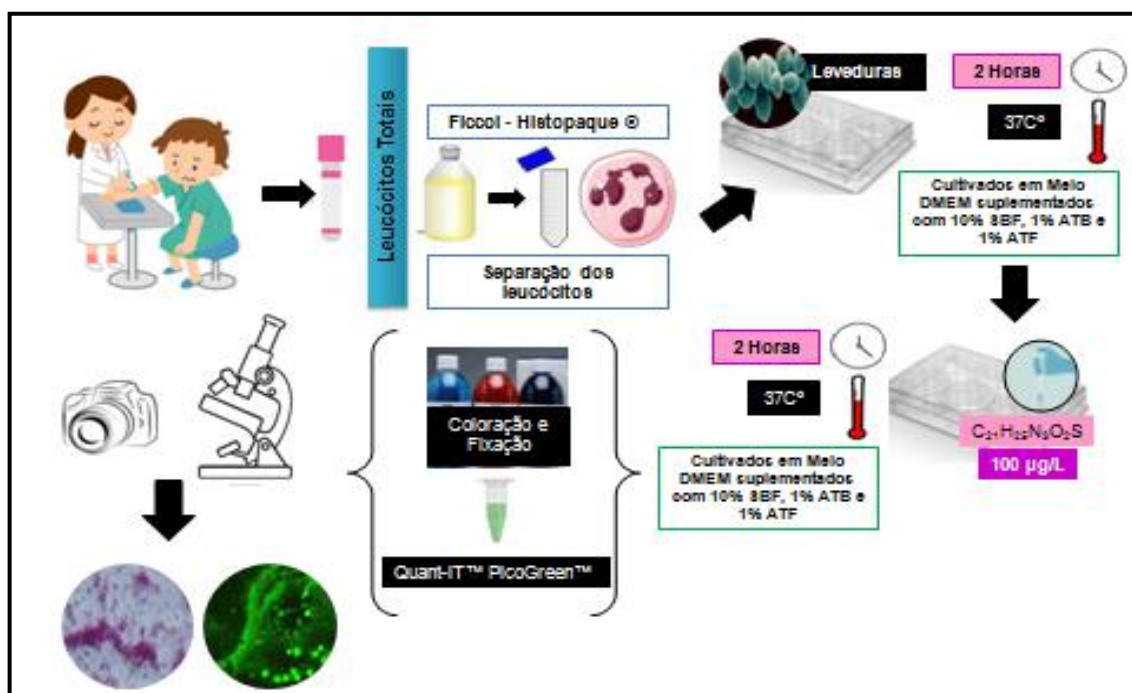
Fonte: A autora.

Figura 13 - Delineamento metodológico geral das análises de viabilidade e citotoxicidade de leucócitos totais e neutrófilos.



Fonte: A autora.

Figura 14 – Delineamento metodológico geral da avaliação de formação de NETs expostas a nmQUE



Fonte: A autora

4 RESULTADOS

Os resultados estão apresentados sob a forma de um manuscrito submetido à revista *Psychopharmacology*, fator de Impacto 3.42, classificada pelo Capes-Periódicos como A2.

4.1 MANUSCRITO

Unmetabolized-Quetiapine has *in vitro* effect on innate immune cells by modulation of inflammatory response and neutrophil extracellular traps (NETs) formation

Bárbara Osmarin Turra, Fernanda Barbisan, Verônica Farina Azzolin, Cibele Ferreira Teixeira, Thamara Flores, Luiza Elisabete Braum, Vitor Braga Rissi, Audrei de Oliveira Alves, Charles Elias Assmann, Ivo Emílio da Cruz Jung, Ivana Beatrice Mânica da Cruz

Abstract

Quetiapine is an antipsychotic drug used to treat some psychiatric and neurological disorders. Despite its efficiency and low-toxicity, quetiapine administration has been associated with undesirable side effects such as development of low-grade inflammatory disorders, as well as neutropenia states. As the liver rapidly metabolizes quetiapine to metabolites, it is possible that the non-metabolised part of this molecule plays a role in immune alterations. An *in vitro* study tested this hypothesis by exposing activated and non-activated RAW-264.7 macrophages cells and humans neutrophils to unmetabolized quetiapine (u-QUE). Results showed that u-QUE was not cytotoxic for these cells. The u-QUE modulate differentially macrophages dependent of its activation-states. In non-activated macrophages, u-QUE induced a proinflammatory state observed by increase in cellular proliferation, increase of oxidative molecules (nitric oxide and superoxide), protein levels and gene overexpression of proinflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF- α) and decreasing of IL-10, an antiinflammatory cytokine. At contrary, on phytohemagglutinin (PHA) activated macrophages u-QUE present an antiinflammatory effect. The u-QUE induced neutrophil extracellular traps (NETs) formation and also increased the sensitivity of NETs formation of neutrophil previously activated by yeast-dead exposure. These results confirm the action of quetiapine on macrophage and neutrophil function that may be associated with side effects of this psychopharmaceutical.

Key-words: Inflammation, cytokines, quetiapine, NETs.

Introduction

Quetiapine, a second antipsychotic generation drug, is widely used in the treatment of several psychiatric and neurological conditions (Mei et al., 2012; Zhornitsky et al., 2013; El Saifi et al., 2016; Robinson et al., 2018; Beyer and Johnson, 2019; Horn et al., 2019; Buyukgol et al., 2019; Ringman and Schneider, 2019; Jin and Liu, 2019; Wanger and Osser, 2019). Despite broad quetiapine use, this drug has been associated with some important side effects, including development of metabolic disorders, especially diabetes *mellitus* type 2 (Hirsch et al., 2017; Nanasawa et al., 2017; Vázquez-Bourgon et al., 2018; Jessen et al., 2019; Sun et al., 2019). There are some reports that quetiapine association with diabetic

ketoacidosis occurrence, a potential fatal metabolic disturb (Vuk et al., 2017; Das et al., 2018). The etiopathology of these metabolic alterations involves low-grade inflammatory states (Donath et al., 2019; Bonacina et al., 2019).

Moreover, there are some previous reports that quetiapine could trigger haematological alterations, mainly neutropenia and agranulocytosis. (Ruhé et al., 2001; Diaz and Hogan, 2001; Shankar et al., 2007; Cowan and Oakley, 2007; Rahman et al., 2009; Lander and Bastiampillai, 2011; Nazer et al., 2012; Cameron, 2012; Fan et al., 2015; Crépeau-Gendron and L'Heureux, 2015; Park and Kim, 2016; Tomita et al. 2017; Glocker et al., 2017).

The causal mechanisms leading to these side effects are not yet fully understood. In fact, there are some difficulties to investigate these mechanisms associated with the side quetiapine effects, due its pharmacokinetics. Quetiapine is rapidly absorbed, and its primary route of elimination is through hepatic metabolism. In the liver, its drug is transformed in 11 metabolites by the cytochrome P450 (CYP) enzymes, primarily by CYP3A (Bakken et al., 2009). Two metabolic are pharmacologically active including N-desalkylquetiapine (norquetiapine) responsible to control several psychiatric symptoms (Bakken et al., 2012). However, the intact unmetabolized quetiapine (u-QUE) appears to be the major circulating species in plasma (23.2% with a maximum plasmatic concentration). The u-QUE concentrations can be influenced by age and by some drug interactions (DeVane and Nemeroff, 2001). Inflammatory status of psychiatric patients has influence on quetiapine metabolism elevating its plasmatic levels (Scherf-Clave et al., 2019).

In this context, it is possible that u-QUE contributes to development of some side effects by differential modulation of peripheral innate immune response that is coordinated mainly by macrophage and neutrophils cells. Therefore, we performed an *in vitro* study in order to elucidate the role of u-QUE on the follow issues: (1) cytotoxic effect on macrophage, total leukocytes and neutrophil cells; (2) modulation of cellular proliferation, oxidative molecules and cytokines protein and gene expression of activated and non-activated macrophage cells; (3) *in vitro* modulation of neutrophil antimicrobial response by evaluation of oxidative molecules concentration and neutrophil extracellular traps (NETs) formation. NETs are characterized by filamentous web-like structures that consist of extruded DNA with presence of neutrophil granule enzymes and histones. Microorganisms are trapped in this network and thus more easily destroyed. In a healthy organism, neutrophil

activation by microorganisms serves to induce higher production of these cells from cellular precursors in the medulla. However, NET dysfunctions triggered by toxic agents could alter this circuit contributing to neutropenia states (Brinkmann et al., 2004; Yousefi et al., 2009; Papayannopoulos, 2018).

Methods

Cell culture conditions and experimental *in vitro* design

This *in vitro* study was performed using an immortalized commercial cell line obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA), murine macrophage RAW 264.7 (ATCC TIB-71), leukocytes and isolated-neutrophils obtained from blood samples of healthy humans. Human blood cells were obtained from volunteers of a research project previously approved by the Ethics Committee of the Federal University of Santa Maria (UFSM) (n° 23,081.015838 / 2011/10), that signed a free and informed consent form.

All cells were cultured in standardized conditions maintained at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ using Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) cultured plus 10% foetal bovine serum (FBS) and antibiotics (1% penicillin/streptomycin) and 1% amphotericin B antifungal. All experiments were three times replicated. Macrophage cells (1×10^5) were seeded in 6-well plates and allowed to adhere for 24 h, and reagents used in cell culture are from Sigma Aldrich (USA), whereas experiments were performed using commercial quetiapine formulation.

Cytotoxicity was initially measured by RAW macrophage, leukocytes and neutrophils u-QUE exposed at different concentrations. The u-QUE curve included two lower and two higher concentrations related to drug therapeutic dosis (100 µg/L): QUE = 25, 50, 100, 200 and 400 µg/L (Schatzberg and Nemeroff, 2009). Whereas macrophages and leukocytes mortality were analysed in 24 h cultures, mortality of isolated-neutrophils was evaluated in 6 h cultures, since these cells has a very short-life time.

Several psychiatric drugs can trigger macrophage-activation inducing higher inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF- α and IFN- γ) levels and lower antiinflammatory cytokines such as IL-10 (Barbisan et al., 2017; Duarte et al., 2018; Fernandes et al., 2019). In this study, we tested u-QUE effect on non-activated macrophages and macrophages previously activated by exposure to

phytohemagglutinin (PHA) at 40 µg/mL concentration. This natural antigen is able to trigger an inflammatory macrophage response leading to cellular proliferation, changes in the macrophage-morphology that presents a spreading phenotype, increasing pro-inflammatory cytokine protein and gene expression levels and decreasing IL-10 concentration (Barbisan et al., 2014). Therefore, these variables were measured in both, activated and non-activated macrophages cultures exposed to therapeutic u-QUE concentration (100 µg/L). We also measured nitric oxide (NO), superoxide anion and reactive oxygen species (ROS) that are elevated in the inflammatory states, which were quantified and compared among treatments.

In the third protocol (ALVES et al., 2019) performed here, the u-QUE effects on human NET formation was evaluated using human isolated-neutrophil exposed just by this drug or exposed initially to yeast-dead cells for 2 hours. Further, yeast exposure, u-QUE at 100 µg/L was added and the size NET-formation was quantified by optic microscopy as subsequently described. The networks decrease in relation to the control group was interpreted as potential u-QUE immunosuppressive effect on NETs. On the other hand, increase in size of neutrophil NETs exposed to yeast was interpreted as increase in the efficiency of antimicrobial response by the drug.

Laboratorial assays

All analyzes performed in the three protocols involving measurement of absorbance or fluorescence were performed with SpectraMax i3x Multi-Mode microplate reader (Molecular Devices- USA). All results were presented as % of control (negative and/or positive) group from triplicate independent analysis.

Cellular viability tests

Cellular viability and cytotoxicity was determined by assay: MTT (3-[4,5dimethylthiazol-2-yl] -2,5-diphenyltetrazolic bromide) described by Barbisan et al (2017).

Macrophage-activation tests

Cellular inflammatory activation by QUE was evaluated by analysis of cellular proliferation, increase in the levels of nitric oxide, superoxide anion and ROS elevation of proinflammatory cytokine levels (IL-1β, IL-10, TNF-α, INF-γ), and subsequent decreasing in the levels of IL-10 levels in 72 h cell cultures. Gene

expression modulation of these cytokines were also compared among macrophage treatments.

Macrophage proliferation was determined in 72 h cell cultures by flow cytometry (BD-Accuri C6- Nova Jersey-USA) in a similar protocol described by and Azzolin *et al* (2016), respectively. The quantification of oxidative molecules was performed using methods previously described in the literature (Morabito *et al*, 2010 and Jung *et al.*, 2016). The ROS production was determined using the 2'-7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA) fluorimetric assay (Barbisan *et al.*, 2014).

The cytokines in the cell culture supernatants was measured, according to the manufacturer's instructions; following previously described methodological details in Jung *et al*, 2015. 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 was conducted under the 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. The q RT-PCR reactions of each sample were made in triplicate, using 1 μ M of each primer, 1000 ng/ μ L of cDNA, RNAase-free water and 2x QuantiFast SYBER[®] Green PCR Master Mix (QIAGEN Biotechnology, Germany), in a final volume of 20 μ L. The beta-actin gene was used as a housekeeping gene, and its expression level was used as an internal control. The relative expression was calculated using the comparative Cytosine-Timine (CT) and was expressed as the fold expression compared to the control.

The specific primer pairs of cytokines are presented used in this study were: IL-1 β Forward 5'-GCGGCATCCAGCTACGAAT-3' and Reverse 3'-ACC AGCATCTTCCTCAGCTTGT-5'; IL-6 Forward 5'-TACCCCCAGGAGAAGATTCCA-3' and -3' Reverse CCGTCGAGGATGTACCGAATT-5'; TNF- α Forward5'- CAA CGGCATGGATCTCAAAGAC-3' and Reverse -3'

TATGGGCTCATACCAGGGTTTG-5'; IL-10 Forward 5'-
 GTGATGCCCAAGCTGAGA-3' and Reverse -3' TGCTCTTG
 TTTTCACAGGGAAGA-5'.

NET-trap assay

The test to measure the formation of NETs will be carried out in a similar way to the protocol described by Alves et al., 2019 with some adaptations, like this: neutrophils isolated from human blood from healthy donors were or were not previously exposed to inactivated yeast cells, in the concentration of 1×10^7 cells / mL, remained so for 2 hours and afterwards were exposed to u- QUE (100µg / L) for another 2 hours.

After incubation, the monolayer of each plate was washed with PBS. NETs were identified using two stain assays: Fast Panoptic kit (FPK) staining (LaborClin, PR, Brazil) as manufacture instruction with slight adaptations to cell culture plates and stained with fluorescent dye using Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Reagent Kit (Invitrogen, USA). In the last assay, was added in each well 20 µL of PicoGreen® dye diluted in 10 mM Tris/HCl was added in each well (100 µL). The plate was stored in the dark at room temperature for 60 min. Further, the NETs present were counted and imaged under fluorescent microscopy. Image capture using PicoGreen® dye fluorescence can be performed in blue (485–500 nm) or green (500–565 nm) when the dye is dsDNA-bounded. The NET size was quantified using Digimizer image analysis software package (version 5.3.5, last modified: January 2019, MedCalc Software, Belgium), which allowed for manual measurements, as well as automatic object detection, with measurements of the object characteristics.

Statistical analysis

Viability, biochemical, immunological and gene expression statistic comparison were carried out using the GraphPad Prism 6.0 software (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Considering that in vitro protocols can increase the variance by experimental errors, all data from independent triplicate tests were normalized as a percentage (%) of the control before performing the statistical tests. This procedure is preconized in the OECD Guidance Document on Good *In vitro* Method Practices (2018). Therefore, all the results were expressed as the mean \pm

standard deviation (SD) % of the control group. Comparison among groups was performed by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's post hoc test. To identify any similarities in the patterns between the different treatments, based on the changes in cytokine gene expression, we used an ordination analysis (Principal Coordinates Analysis (PCoA) with Euclidean distance) performed using the MULTIV 3.55 statistical package. Considering that the average size of the perimeter of NETs was quite variable and without a normal distribution, the comparison of the samples was based on the medians through non-parametric KruskalWallis analysis. The alpha value was set to ≤ 0.05 to determine the statistical relevance

Results

In the first protocol, u-QUE effects on immune cells viability was investigated. Results did not show direct u-QUE cytotoxicity on RAW-macrophages, total white blood cells 24 h cultures and neutrophils 6 h cultures (Fig 1).

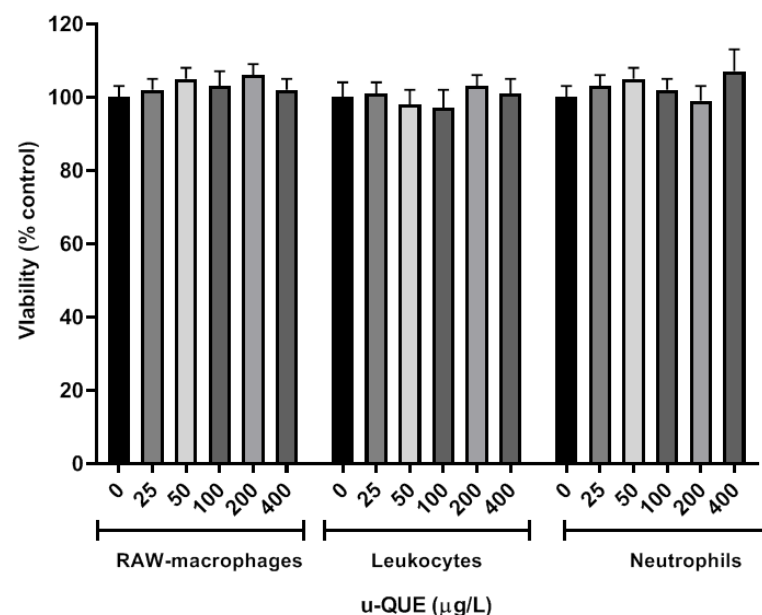


Figure 1 Viability measured by MTT-spectrophometric assay of 24 h macrophage and total leukocytes cultures and 6 h neutrophil-isolated cultures exposed to different concentrations of unmetabolized quetiapine (u-QUE). Statistical comparison was performed by One-Way analysis of variance followed by post hoc Tukey test. In assay was not find any statistical differences among u-QUE concentrations tested here.

Potential proinflammatory u-QUE effects was also analysed using non-activated and activated RAW macrophage by PHA-exposure in 72 h cell cultures. The u-QUE changed macrophage morphology increasing cells with spreaded phenotype when compared to control group. This effect was similar to cells PHA-exposed and PHA plus u-QUE-exposed (Fig 2A). The u-QUE exposure triggered higher cellular proliferation than control group evaluated by cell cycle flow cytometry. However, this effect was lower than macrophage PHA-exposed. When cells where concomitantly treated with PHA plus u-QUE, S-phase cells returned to similar frequency observed in the control group (Fig 2B).

Modulation of oxidative molecules that are also part of inflammatory response was compared among macrophages exposed to different treatments. Both, PHA and u-QUE cells presented higher NO, superoxide and ROS levels than control group. However, PHA plus u-QUE treatment showed similar levels of these molecules than control group, with the exception of ROS, where the condition did not reestablished itself.

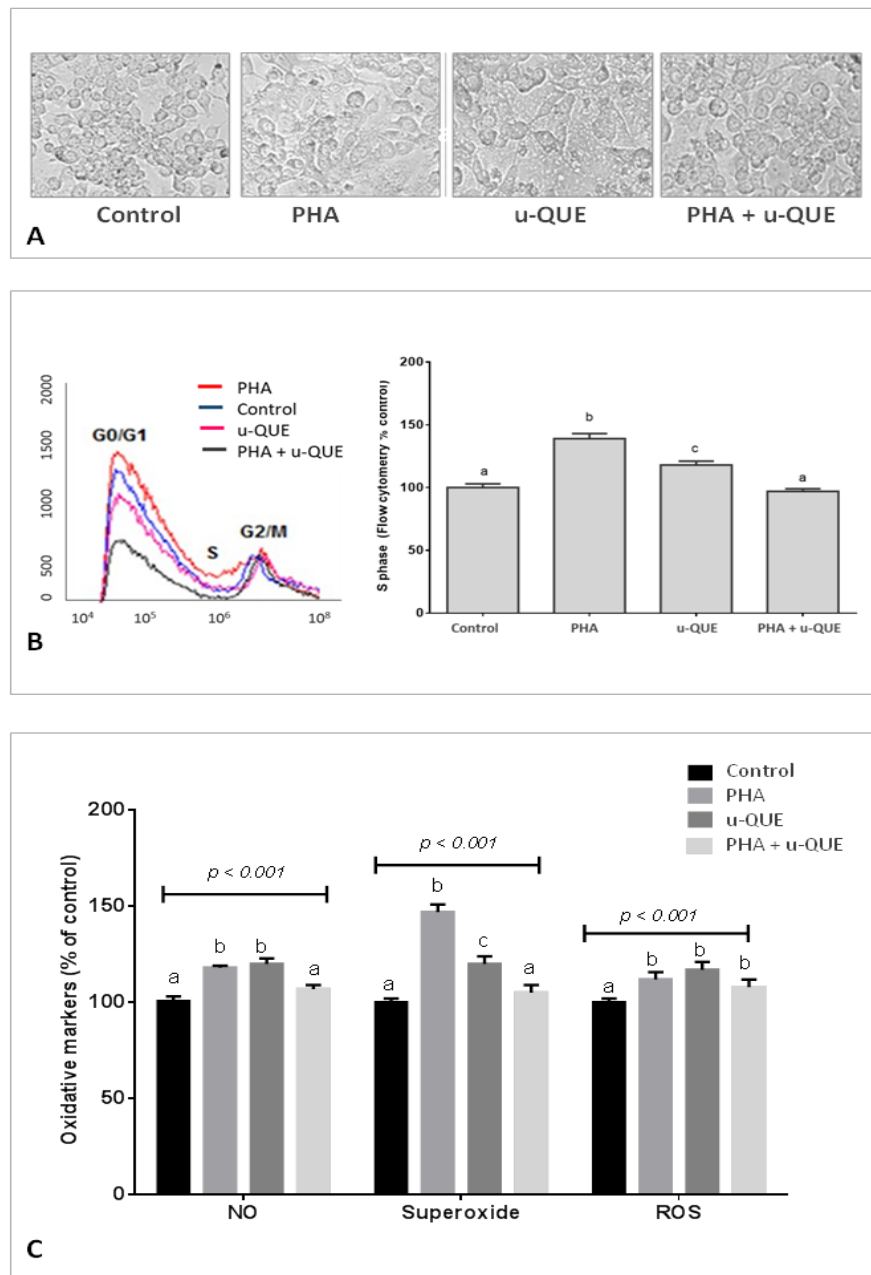


Figure 2 Inflammatory modulation of non-activated and phytohemagglutinin (PHA) activated 72 h RAW-macrophages cultures with and without unmetabolized-quetiapine (U-QUE) exposure (100 $\mu\text{g/L}$). (A) representative microphotographic of macrophage monolayer cultures without inflammatory activation (control = C), PHA-activated; (B) cell cycle flow cytometry of 72 h macrophage cultures showing u-QUE cellular proliferation induction by increase of S-phase cells; (C) oxidative molecules related to inflammatory response: nitric oxide (NO), superoxide anion, reactive oxygen molecules (ROS). All data are presented as % of untreated control group. Statistical comparison was performed by One-Way analysis of variance followed by *post hoc* Tukey test. Statistical differences ($p < 0.05$) among treatment groups are represented by different alphabetical letters (a, b, c...).

Cytokine protein and gene expression modulation was also directly influenced by u-QUE exposure. Notably u-QUE increased significantly proinflammatory cytokines and decreased IL-10 levels in 72 h cultures in a similar way of macrophages PHA-

exposed. The interaction between PHA and u-QUE nullified this effect (Figure 3A). A similar pattern was observed in the analysis of gene expression (Figure 3B), which occurs on the expression of pro-inflammatory cytokines and the negative response of the IL-10 anti-inflammatory cytokine gene in cells exposed to QUE and PHA. Again, an interaction between PHA and QUE shows inverse results: the low reduced pro-inflammatory cytokine genes when compared to macrophages not activated by the control group. However, in this treatment, the IL-10 gene was also deregulated.

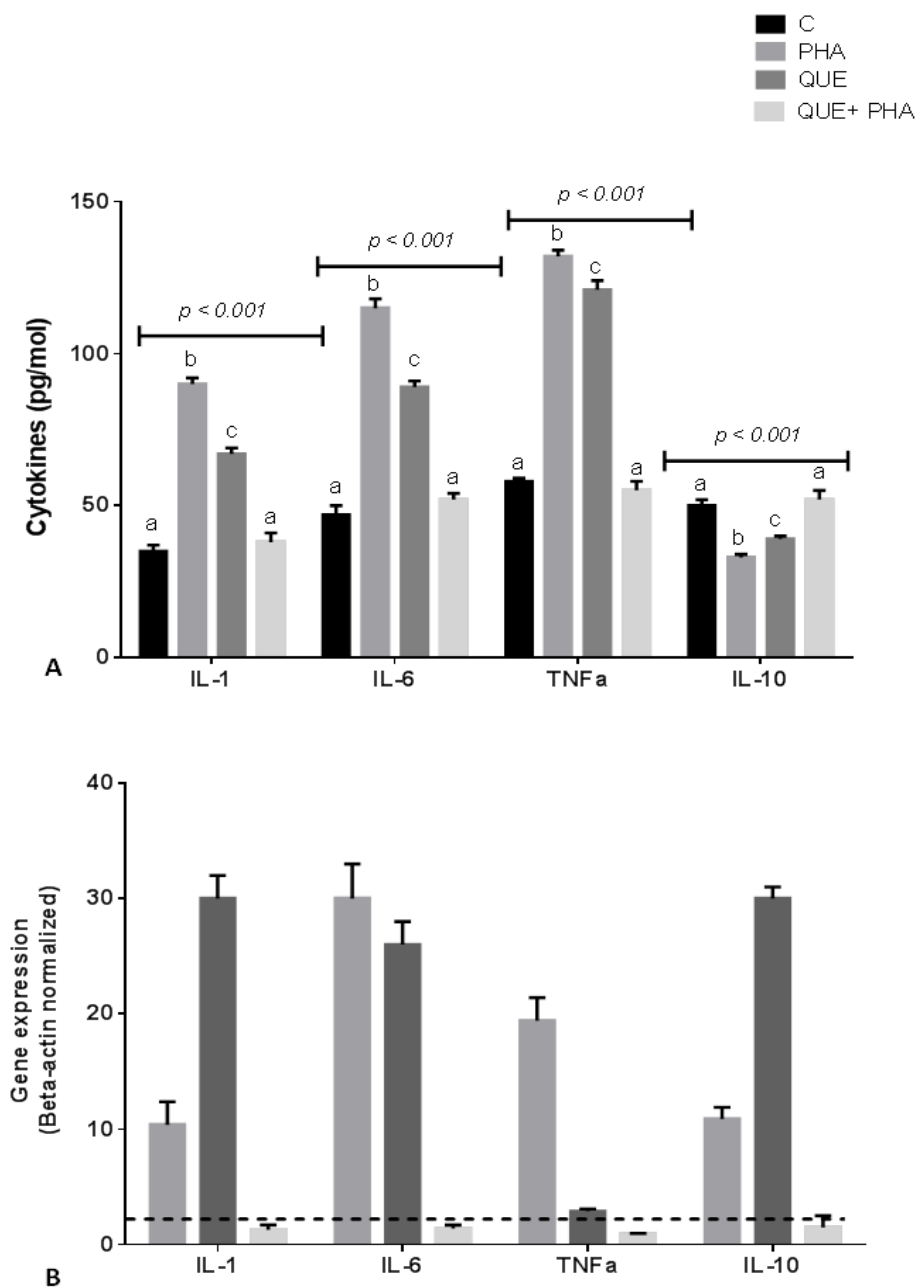


Figure 3 Cytokines protein (A) and gene expression (B) modulation of non-activated and phytohemagglutinin (PHA) activated 72 h RAW-macrophages cultures with and without unmetabolized-quetiapine (U-QUE) exposure (100 μ g/L). In the genic expression the dashed line represents the control group that has a value of 1 in its expression. In this analysis cytokine gene expression were normalized by β -actin housekeeping gene. Protein cytokine data are presented as % of untreated control group. Statistical comparison was performed by One-Way analysis of variance followed by *post hoc* Tukey test. Statistical differences ($p < 0.05$) among treatment groups are represented by different alphabetical letters (a, b, c...).

The u-QUE also has significant influence on NET formation with and without yeast-dead challenge ($p \leq 0.0001$) (Figures 4 and 5). As expected, cells yeast (CY), CY-group present higher NETs areas (median = 31.5×10^8 pixel) than non-activated control group (median = 22.8×10^8 pixel). Neutrophils just u-QUE exposed had higher effect on NETs induction (median = 55.0×10^8 pixel) than CY-activated cells. On neutrophils, 2 h CY-exposure followed by u-QUE-exposure triggered and extensive NETs areas than other treatments increasing more than 8 times when compared to untreated control group. These last data suggested that in neutrophils previously activated by microorganisms, u-QUE potencialize the NET formations.

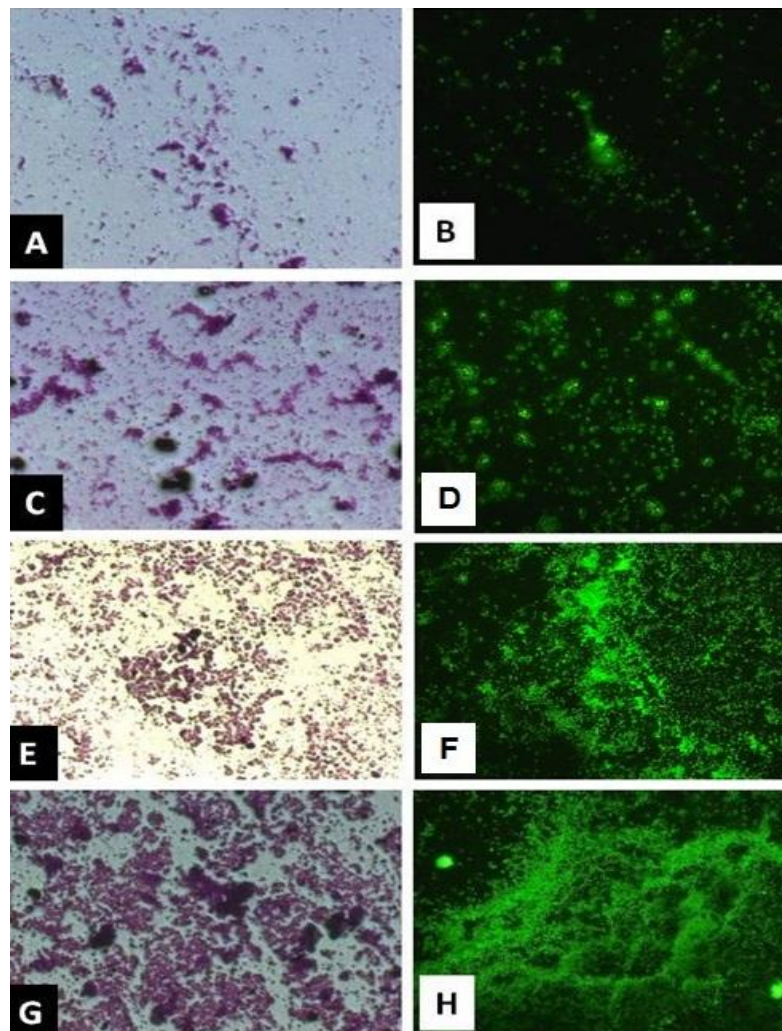


Figure 4 Representative optical microphotographic of neutrophil extracellular traps (NETs) formation (20 x) stained with panoptic kit (A,C,E, G) and fluorimetric DNA Picogreen® dye that has high affinity to double-strand DNA molecules (B, D, F, H). Images represents: untreated control neutrophils (A,B); neutrophils activated by yeast-dead exposure (C,D); non-activated neutrophil exposed to unmetabolized-quetiapine (u-QUE) at 100 µg/L (E,F) and neutrophils activated by yeast-dead exposure with further u-QUE exposure.

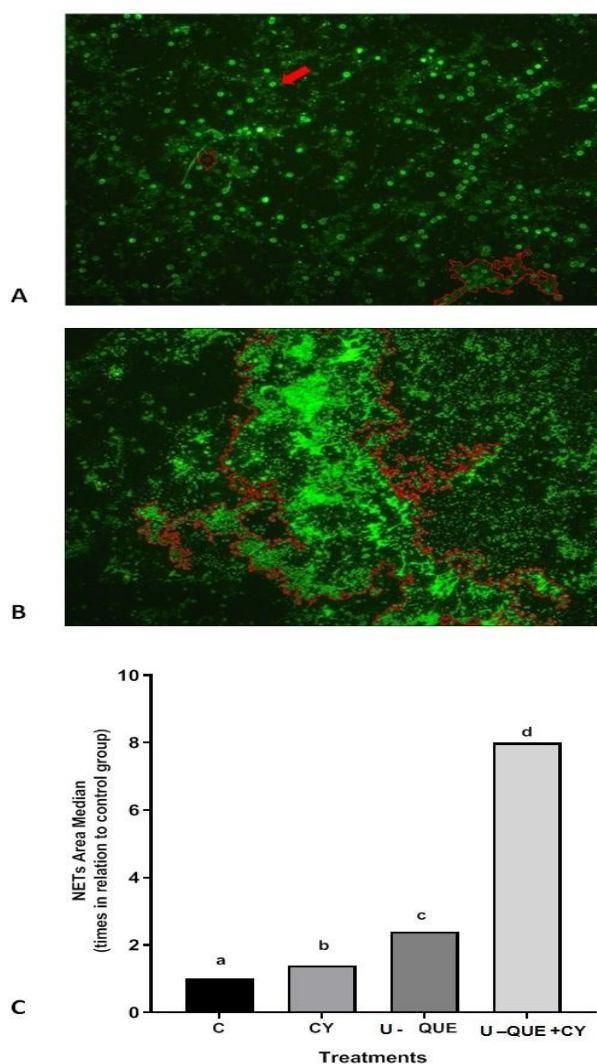


Figure 5 Neutrophil extracellular traps (NETs) formation (A) optical representative microphotographic of control and yeast-dead activation neutrophils stained by fluorimetric DNA Picogreen® dye showing intact neutrophils and (red arrow) and the beginning of the formation of DNA networks with area outlined by the red line; (B) NETs formed after 4 hours of exposure to dead yeast and unmetabolized quetiapine (u-QUE). The area of the NETs formed and delimited by the red line was quantified and served to compare the formation of the NETs in the different treatments; (C) Comparison between the area of NETs (in pixels) between non-activated neutrophils (Control), activated with dead yeast, exposed to unmetabolized quetiapine (u-QUE) and previously exposed to yeast for 2 hours and subsequently to u-QUE. As the data do not have parametric distribution the statistics were compared by Kruskal-Wallis analysis followed by the median test. Results were graphically expressed by the relative number of times the median of treatments increased relative to the control group. Statistical differences ($p < 0.05$) among treatment groups are represented by different alphabetical letters (a, b, c...).

Discussion

In the present investigation we analysed the potential u-QUE effect on macrophage-neutrophil activity considering that this antipsychotic presents several undesirable effects that are associated with changes in the innate immune response.

Since quetiapine is a rapidly metabolised drug (De Vane and Nemeroff, 2001), we focus our attention on the portion that remains unchanged, which has been identified here as u-QUE. In general, the results confirmed that u-QUE is able to modulate both macrophage and also showed modulation of neutrophil activity by this drug, having no direct cytotoxic effect on these cells.

However, the action of u-QUE on macrophages was dependent on the previous inflammatory activation state of these cells. In non-activated macrophages u-QUE triggered a consistent inflammatory response, with increased cell proliferation rate, monolayer showing spindle-like and scattered macrophages, high levels of NO and superoxide, increased levels and gene expression of proinflammatory cytokines, and subsequent decreased gene and protein expression of anti-inflammatory cytokine IL-10. At contrary, u-QUE effect on PHA-activated macrophage exhibited an antiinflammatory behaviour, decreasing cell proliferation rate, reducing protein and gene expression of proinflammatory cytokines similar to those observed in the untreated control group.

Despite the apparent controversy between these results, they are consistent with studies previously published in the literature. This differential action could to explain why quetiapine could present an anti-inflammatory effect on neural tissues, which generally are inflamed in schizophrenic or patients that present psychosis states (Katzman et al., 2007; Al-Amin et a., 2013, Hasnain, 2015; Hefner et al., 2016). A recent investigation performed by Mantere et al (2019) described immunomodulatory effect of QUE in first-episode psychosis patients, despite this effect to be less intense than patients treated with other antipsychotic drugs, such as risperidone. Quetiapine also seems attenuate neuroinflammation and improve executive deficit of streptozocin-induced diabetic mice (Wang et al., 2019). In neuroinflammatory states caused by physical injury quetiapine also presents protective due its anti-inflammatory properties (Robinson et al., 2018). The potential quetiapine and its active metabolite norquetiapine antiinflammatory effect was also described by Jaehne et al (2015) in a study using rats as experimental model with systemic inflammatory state induced by lipopolysaccharide (LPS). Complementary studies using quetiapine in experimental models of systemic inflammatory diseases such as arthritis also showed potential anti-inflammatory action of quetiapine (Pan et al., 2018).

However, as the neuroinflammation found in psychiatric patients, especially schizophrenic patients, does not necessarily imply a concomitant existence of systemic inflammatory state. In these terms, it is possible that the action of quetiapine and its active metabolite is dual: in inflamed tissues it has an antiinflammatory effect, while in non-inflamed tissues it has a proinflammatory effect. This duality could then explain why continued use of this psychopharmaceutical would contribute to the establishment of disorders associated with low-grade inflammation such as type 2 diabetes (Hirsch et al., 2017; Nanasawa et al., 2017). There are consistent studies suggesting that u-QUE and norquetiapine increase low-grade peripheral inflammation in schizophrenic patients (Fond et al., 2018). Moreover, quetiapine administration has been associated with cardiotoxicity by inflammatory infiltration in heart tissue and fibrosis development (Li et al., 2019). This dual effect of quetiapine is of clinical relevance and for this reason studies that seek to identify drugs that attenuate proinflammatory action in tissues without prior inflammation are of great relevance. Unfortunately, the number of investigations on this topic is still quite incipient. Among these, we can highlight the investigation performed by Li et al (2019) that showed protective effect of some molecules, such as Rimonabant that inactivated myocardial necrosis induced by quetiapine.

The other result found here concerns the effect of quetiapine on neutrophil function. Despite reports of neutropenia and agranulocytosis caused by quetiapine treatment, no direct cytotoxicity of u-QUE on leukocytes and neutrophils-isolates was observed here. Therefore, the action of quetiapine on these cells may involve other pathways. In the present investigation was observed that u-QUE triggered higher formation of NETs, in both non-activated and activated neutrophils by yeast-dead exposure. The results suggested that u-QUE could induce the formation of NETs or increase the sensitivity of neutrophils activated by the presence of microorganisms by enhancing their formation.

Both results are relevant since, induction in the aberrant formation of NETs without the presence of microorganisms or physical injury is associated with diseases, such as autoimmune diseases. Neutrophils are cells that represent the first line of defence against invading microorganisms or repairing physical injuries to the body. Several extracellular and intracellular microorganisms induce neutrophils to extrude NETs through the process known as NETosis (Kobayashi, 2015). However, previous evidence suggested that NETs formation might have a role in noninfectious

diseases, such as autoimmune disorders, such as lupus erythematosus and rheumatoid arthritis and also diabetes mellitus (Jorch and Kubes, 2017). Moreover, NETs formation is associated with diabetes complications such as retinopathy (Wang et al., 2019) and delays of wound healing (Fadini et al., 2016). As autoimmune patients present high levels of inflammatory cytokines this condition sensitizes neutrophils to NETosis (Kobayashi, 2015). In this context it is possible that induction and sensitization of NETs by u-QUE may play a role in the development of metabolic disorders and morbidities such as diabetes mellitus. Furthermore, it is important to point out that previously was described that other pharmacological drugs as hydralazine and procainamide are able to induce NET formation. However, this action is not universal and did not find in neutrophils exposed to antipsychotic clozapine (Irizarry-Caro et al., 2018).

As quetiapine has been associated with neutropenia occurrence, mainly by abuse or interaction with other pharmacological drugs (Rahman et al., 2009; Halaby and Haddad, 2013; Pilgrim and Drummer, 2013; Somani et al., Klein-Schwartz et al., 2014; Almaghrebi, 2019; Hughes, 2019), it is possible that aberrant NET formation induced by u-QUE described here could contribute to this clinical side effect. In this case, we did not can discard that u-QUE will increase stimulation of NETs formation could not trigger a positive feedback to blood marrow produce and replenish the neutrophils used in the NET formation.

This could explain the occurrence of quetiapine-induced neutropenia in some patients (Rahman et al., 2009; Lander et al., 2011; Nazer et al., 2012; Glocker et al., 2017), mainly by the u-QUE presence in peripheral circulation. However, this hypothesis needs to be further tested possibly using rodents as experimental models.

Therefore, despite the methodological limitations associated with in vitro studies, the results presented here indicate that u-QUE can act directly in modulating the innate immune response. In this case, it seems that this drug is capable of acting on both macrophages and neutrophils. In the former, it has a dual action, increasing or decreasing inflammatory markers depending on the previous state of macrophage activation. In neutrophils, u-QUE seems to induce or even increase the production of NETs, which could also contribute to the development of side effects.

Acknowledgments

The authors would like to thank Dr. Marta Medeiros Frescura Duarte Duarte for the dosing of cytokines and all the researchers from the Biogenomics Lab Research (UFSM) who contributed to the execution of the experimental protocols. Acknowledgments to Brazilian funding agencies: CNPq, CAPES and FAPERGS for the scholarships and support for the research.

References

- AL-AMIN, M.M.; REZA, H.M. **Neuroinflammation: Contemporary anti-inflammatory treatment approaches**. *Neurociências (Riyadh)*, v. 19, n. 2, p.87-92, 2014.
- ALMAGHREBI, A.H. **Safety of a Clozapine Trial Following Quetiapine-Induced Leukopenia: A Case Report**. *Current Drug Safety*, v. 14, n. 1, p. 80-83, 2019.
- ALVES, A. O. et al. **Caffeinated beverages contribute to a more efficient inflammatory response: Evidence from human and earthworm immune cells**. *Food and Chemical Toxicology*, v. 134, n. 110809, p. 1-12, 2019.
- AZZOLIN, V. F. et al. **Superoxide – hydrogen peroxide imbalance interferes with colorectal cancer cells viability, proliferation and oxaliplatin response**. *Toxicology In Vitro*, v. 32, p. 8-15, 2016.
- BAKKEN, G.V. et al. **Metabolism of quetiapine by CYP3A4 and CYP3A5 in presence or absence of cytochrome B5**. *Drug Metabolism and Disposition*, v.37, n. 2, p. 254–258, 2009.
- BARBISAN, F. et al. **Methotrexate – related response on human peripheral blood mononuclear cells may be modulated by the Ala16Val-SOD2 gene polymorphism**. *Plos One*, v. 9, n. 10, p. 1-11, 2014.
- BARBISAN, F. et al. **The In Vitro Influence of a Genetic Superoxide-Hydrogen Peroxide Imbalance on Immunosenescence**. *Rejuvenation Research*, v. 20, n.4, p. 334-345, 2017.
- BEYER, J. L.; JOHNSON, K.G. **Advances in Pharmacotherapy of Late-Life Depression**. *Current Psychiatry Reports*, v. 20, n. 5, p. 1-11, 2018.
- BONACINA, F. et al. **The Interconnection Between Immuno-Metabolism, Diabetes, and CKD**. *Current Diabetes Reports*, v. 19, n. 5, p. 1-21, 2019.
- BRINKMANN, V. et al. **Neutrophil extracellular traps kill bacteria**. *Science*, v. 303, n. 5663, p. 1532-1535, 2004.

- BUYUKGOL, H.; ILIK, F.; ERTEM, D.H. **Evaluation of the Clinical Features, Management, and Prognoses of Patients With Charles Bonnet Syndrome.** *The Journal of Nervous and Mental Disease*, v. 207, n. 12, p. 1045-1047, 2019.
- COWAN, C.; OAKLEY, C. **Leukopenia and neutropenia induced by quetiapine.** *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, v.31, n.1, p.292–294, 2007.
- CRÉPEAU-GENDRON, G.; L'HEUREUX, S. **Quetiapine XR-induced neutropenia: is a clozapine trial still possible for treatment-resistant schizophrenia? A case report.** *Early Intervention in Psychiatry*, v. 9, n. 2, p.151-155, 2015.
- DAS, S. et al. **Quetiapine-induced Diabetic Ketoacidosis.** *Indian Journal of Psychological Medicine*, v. 40, n. 1, p. 93-95, 2018.
- DEVANE, C.L.; NEMEROFF, C.B. **Clinical pharmacokinetics of quetiapine: an atypical antipsychotic.** *Clinical Pharmacokinetics*, v.40, n. 7, p. 509-522, 2001.
- DIAZ, P.; HOGAN, T.P. **Granulocytopenia with clozapine and quetiapine.** *American Journal of Psychiatry*, v. 158, n. 4, p. 1-6, 2001.
- DONATH, M.Y.; DINARELLO, C.A.; MANDRUP-POULSEN, T. **Targeting innate immune mediators in type 1 and type 2 diabetes.** *Nature Reviews Immunology*, v. 19, n. 12, p. 734 -746, 2019.
- DUARTE, T. et al. **Ziprasidone, a second-generation antipsychotic drug, triggers a macrophage inflammatory response in vitro.** *Cytokine*, v. 106, p. 101-107, 2018.
- EL – SAIFI, N.; JONES, C.; MOYLE, W. **Quetiapine adverse events in older adults in Australia.** *Australasian Journal on Ageing*, v. 35, n.4, p. 281-284, 2016.
- FADINI, G.P. et al. **NETosis Delays Diabetic Wound Healing in Mice and Humans.** *Diabetes*, v. 65, n. 4, p. 1061–1071, 2016.
- FAN, K.Y.; CHEN, W.Y.; HUANG, M.C. **Quetiapine-associated leucopenia and thrombocytopenia: a case report.** *BMC Psychiatry*, v. 15, n.110, p.1-3, 2015.
- FERNANDES, M.S. et al. **Lithium is able to minimize olanzapine oxidative-inflammatory induction on macrophage cells.** *PLoS One*, v.14, n. 1, p. 1-16, 2019.
- FOND, G. et al. **Relationships between low-grade peripheral inflammation and psychotropic drugs in schizophrenia: results from the national FACE-SZ cohort.** *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, v. 286, n. 6, p. 541-553, 2018.
- GLOCKER, C.; GROHMANN, R.; SCHULZ, H. **Fatal Agranulocytosis Associated With Quetiapine in Monotherapy: A Case Report.** *Journal of Clinical Psychopharmacology*, v. 37, n. 5, p. 625-627, 2017.

HALABY, A.; HADDAD, R.; NAJA, W. J. **Hyperammonemia induced by interaction of valproate and quetiapine.** *Current Drug Safety*, v. 8, n. 4, p. 284-286, 2013.

HASNAIN, M. **Genetic vulnerability in antipsychotic drug-induced diabetes.** *Lancet Psychiatry*, v. 2, n. 12, p. 1049-1051, 2015.

HEFNER, G. et al. **Inflammation and psychotropic drugs: the relationship between C-reactive protein and antipsychotic drug levels.** *Psychopharmacology (Berl)*, v. 233, n. 9, p. 1695-1705, 2016.

HIRSCH, L. et al. **Second-Generation Antipsychotics and Metabolic Side Effects: A Systematic Review of Population-Based Studies.** *Drug Safety*, v.40, n.9, p. 771-781, 2017.

HORN, S. et al. **Pimavanserin versus quetiapine for the treatment of psychosis in Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies.** *Parkinsonism and Related Disorders*, v. 69 , p.119-124, 2019.

HUGHES, R. L. **Fatal combination of mitragynine and quetiapine - a case report with discussion of a potential herb-drug interaction.** *Forensic Science Medicine and Pathology*, v. 15, n. 1, p. 110-113, 2019.

IRIZARRY-CARO, J. A. et al. **Brief Report: Drugs Implicated in Systemic Autoimmunity Modulate Neutrophil Extracellular Trap Formation.** *Arthritis and Rheumatology*, v. 70, n. 3, p. 468-474, 2018.

JAEHNE, E.J. et al. **The effect of the antipsychotic drug quetiapine and its metabolite norquetiapine on acute inflammation, memory and anhedonia.** *Pharmacology, Biochemistry Behavior*, v. 135, p.136-44, 2015.

JENSEN, K. G. et al. **Cardiometabolic Adverse Effects and Its Predictors in Children and Adolescents With First-Episode Psychosis During Treatment With Quetiapine-Extended Release Versus Aripiprazole: 12-Week Results From the Tolerance and Effect of Antipsychotics in Children and Adolescents With Psychosis (TEA) Trial.** *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*, v. 58, n. 11, p. 1062-1078, 2019.

JIN, B.; LIU, H. **Comparative efficacy and safety of therapy for the behavioral and psychological symptoms of dementia: a systemic review and Bayesian network meta-analysis.** *Journal of Neurology* v. 266, n.10, p. 2363-2375, 2019.

JORCH, S.K.; KUBES, P. **An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease.** *Nature Medicine*, v. 23, n. 3, p. 279-287, 2017.

JUNG, I. E. C. et al. **Haloperidol and Risperidone at high concentrations activate an in vitro inflammatory response of RAW 264.7 macrophage cells by induction of apoptosis and modification of cytokine levels.** *Psychopharmacology*, v. 233, n.9, p. 1715-1723, 2016.

- KATZMAN, M. A. et al. **Weight gain and psychiatric treatment: Is there a role for green tea and conjugated linoleic acid?**. *Lipids in Health and Disease*, v. 6, n.14, p. 1-4, 2007.
- KLEIN-SCHWARTZ, W.; SCHWARTZ, E.K.; ANDERSON, B.D. **Evaluation of quetiapine abuse and misuse reported to poison centers**. *Journal of Addiction Medicine*, v. 8, n. 3, p. 195-198, 2014.
- KOBAYASHI, Y. **Neutrophil biology: an update**. *Journal Experimental and Clinical Sciences*, v. 14, p. 220-227, 2015.
- LANDER, M.; BASTIAMPILLAI, T. **Neutropenia associated with quetiapine, olanzapine, and aripiprazole**. *Australian and New Zealand Journal of Psychiatry*, v. 45, n. 1, p. 1-2, 2011.
- LI, X. et al. **Quetiapine induces myocardial necroptotic cell death through bidirectional regulation of cannabinoid receptors**. *Toxicology Letters*, v.313, p.77-90, 2019.
- LI, X.; CAMERON, M.D. **Potential role of a quetiapine metabolite in quetiapine-induced neutropenia and agranulocytosis**. *Chemical Research in Toxicology*, v.25, n. 5, p. 1004-1011, 2012.
- MANTERE, O. et al. **Immunomodulatory effects of antipsychotic treatment on gene expression in first-episode psychosis**. *Journal of Psychiatric Research*, v.109, p.18-26, 2019.
- MEI, F. et al. **Quetiapine, an atypical antipsychotic, is protective against autoimmune-mediated demyelination by inhibiting effector T cell proliferation**. *PLoS One*, v. 7, n. 8, p., 2012.
- MORABITO, C. et al. **Modulation of redox status and calcium handling by extremely low frequency electromagnetic fields in C2C12 muscle cells: A real-time, single- cell approach**. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 48, p. 579-589, 2010.
- NANASAWA, H. et al. **Development of diabetes mellitus associated with quetiapine: A case series**. *Medicine*, v. 96, n. 3, p. 1-6, 2017.
- NAZER, L.H. et al. **Fatal agranulocytosis associated with psychotropic medication use**. *American Journal of Health-System Pharmacy*, v. 69, n.10, p. 863-867, 2012.
- PAN, Y. J. et al. **Quetiapine ameliorates collagen-induced arthritis in mice via the suppression of the AKT and ERK signaling pathways**. *Inflammation Research*, v. 67, n. 10, p. 847-861, 2018.
- PAPAYANNOPOULOS, V. **Neutrophil extracellular traps in immunity and disease**. *Nature Reviews Immunology*, v. 18, n. 2, p. 134-147, 2018.

PARK, H. J.; KIM, J.Y. **Incidence of Neutropenia With Valproate and Quetiapine Combination Treatment in Subjects With Acquired Brain Injuries.** Archives of Physical Medicine and Rehabilitation, v. 97, n. 2, p. 183-188, 2016.

PILGRIM, J.L.; DRUMMER, O.H. **The toxicology and comorbidities of fatal cases involving quetiapine.** Forensic Science Medicine and Pathology, v. 9, n. 2, p. 170-176, 2013.

RAHMAN, A. et al. **Evaluating the incidence of leukopenia and neutropenia with valproate, quetiapine, or the combination in children and adolescents.** Annals of Pharmacotherapy, v.43, n. 5, p. 822–830, 2009.

RINGMAN, J.M.; SCHNEIDER, L. **Treatment Options for Agitation in Dementia.** Current Treatment Options in Neurology, v. 21, n. 7, p. 21-30, 2019.

ROBINSON, B. D. et al. **Quetiapine protects the blood-brain barrier in traumatic brain injury,** The Journal of Trauma and Acute Care Surgery v. 85, n. 5, p. 968-976, 2018.

RUHÉ, H.G. et al. **Agranulocytosis and granulocytopenia associated with quetiapine.** Acta Psychiatrica Scandinavica, v. 104, n. 4, p. 311–313, 2001.

SCHATZBERG, A. F; NEMEROFF, C.B. **The American psychiatric publishing textbook of psychopharmacology,** 4 ed, 2009.

SCHERF-CLAVEL, M. et al. **Pathological Concentration of C-reactive Protein is Correlated to Increased Concentrations of Quetiapine, But Not of Risperidone, Olanzapine and Aripiprazole in a Naturalistic Setting.** Pharmacopsychiatry, p. 1-6, 2019.

SHANKAR, B.R. **Quetiapine-induced leucopenia and thrombocytopenia.** Psychosomatics, v.48, n.6, p. 530–531, 2007.

SOMANI, A.; SHARMA, M.; SINGH, S.M. **Neutropenia associated with quetiapine and sertraline: A case report and review of literature.** Asian Journal of Psychiatry, v. 26, p. 129-130, 2017.

SUN, A.Y. et al. **Safety considerations in the psychopharmacology of pediatric bipolar disorder.** Expert Opinion on Drug Safety, v. 18, n. 9, p. 777-794, 2019.

TOMITA, T. et al. **Leukocytopenia in patients treated with multiple antipsychotics, including aripiprazole and quetiapine.** Psychiatry and Clinical Neurosciences, v. 71, n. 1, p. 71-72, 2017.

VÁZQUEZ-BOURGON, J. et al. **Long-term metabolic effects of aripiprazole, ziprasidone and quetiapine: a pragmatic clinical trial in drug-naïve patients with a first-episode of non-affective psychosis.** Psychopharmacology (Berl), v.235, n. 1, p. 245-255, 2018.

VUK, A. et al. **Diabetic ketoacidosis associated with antipsychotic drugs: case reports and a review of literature.** Psychiatria Danubina, v. 29, n. 2, p. 121-135, 2017.

WANG, D.; OSSER, D.N. **The Psychopharmacology Algorithm Project at the Harvard South Shore Program: An update on bipolar depression.** Bipolar Disord, v.10, n.6, p. 1-12, 2019.

WANG, K. et al. **Quetiapine Attenuates the Neuroinflammation and Executive Function Deficit in Streptozotocin-Induced Diabetic Mice.** Mediators of Inflammation, v. 2019, n. 1236082, p. 1-8, 2019.

YOUSEFI, S. et al. **Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps.** Cell Death & Differentiation, v. 16, n.11, p.1438-1444, 2009.

ZHORNITSKY, S. et al. **Quetiapine fumarate for the treatment of multiple sclerosis: focus on myelin repair.** CNS Neuroscience & Therapeutics, v. 19, n.10, p. 737-44, 2013.

5 DISCUSSÃO

Este estudo buscou avaliar a relação da QUE, na sua forma não metabolizada, considerando os efeitos que esse antipsicótico possui na relação interdependente entre estresse oxidativo – inflamação e feitos posteriores na imunidade inata, avaliamos o potencial efeito desempenhado no sistema macrófagos - leucócitos – neutrófilos. Em geral, os estudos confirmam que o fármaco possui capacidade modulatória na atividade dos macrófagos e neutrófilos, e não apresenta potencial efeito citotóxico direto nas células. Porém, essa importante atividade na inflamação mostra-se dependente do estado inicial em que as células se encontram.

Dessa forma, nosso estudo demonstrou que em macrófagos não ativados, a nmQUE desencadeou uma resposta inflamatória consistente, com taxa de proliferação celular aumentada, monocamada mostrando macrófagos dispersos e semelhantes a fusos, altos níveis de ON e O_2^- , níveis aumentados e expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, TNF- α) e, subsequente diminuição de genes e expressão proteica da citocina anti-inflamatória (IL-10). Pelo contrário, o efeito nmQUE nos macrófagos ativados por PHA exibiu um comportamento anti-inflamatório, diminuindo a taxa de proliferação celular, reduzindo a expressão proteica e gênica de citocinas pró-inflamatórias, semelhantes às observadas no grupo controle não tratado.

Essa aparente contradição é consistente com estudos publicados anteriormente na literatura. Essa propriedade diferenciada da QUE pode explicar o porquê de o fármaco apresentar um efeito anti-inflamatório nos tecidos neurais, que são inflamados na SZC ou em pacientes que apresentam estados de psicose (HASNAIN, 2015; HEFNER et al., 2016; OWEN; SAWA; MORTENSEN, 2016).

Um estudo realizado por Manter e colaboradores (2019) descreveu o efeito imunomodulador da QUE em pacientes com psicose no primeiro episódio, apesar desse efeito ser menos intenso do que em pacientes tratados com outros medicamentos antipsicóticos, como a Risperidona. A QUE também parece atenuar a neuroinflamação e melhorar o déficit executivo de camundongos diabéticos induzidos por estreptozocina (WANG et al., 2019). Nos estados neuroinflamatórios causados por lesões físicas, ela apresentou proteção devido às suas propriedades anti-inflamatórias (CHEN; NASRALLAH, 2019; ROBINSON et al., 2018). O efeito

anti-inflamatório da norquetiapina, seu metabólito ativo, também é descrito por Jaehne et al (2015) em um estudo utilizando ratos como modelo experimental, com estado inflamatório sistêmico induzido por LPS. Estudos complementares usando QUE em modelos experimentais de doenças inflamatórias sistêmicas, como a artrite, também mostraram uma potencial ação anti-inflamatória (KIM et al., 2012; PAN et al., 2018).

No entanto, a neuroinflamação encontrada na SCZ não implica necessariamente na existência concomitante de um estado inflamatório sistêmico. Nessas circunstâncias, é possível que a ação da QUE e da norquetiapina seja dupla: nos tecidos inflamados, ela tem um efeito anti-inflamatório, enquanto nos tecidos não inflamados, ela tem um efeito pró-inflamatório. Essa dualidade poderia então explicar por que o uso continuado desse psicofármaco contribui para o estabelecimento de distúrbios associados à inflamação de baixo grau, como o diabetes tipo 2, por exemplo (GALLING; CORRELL, 2015; HIRSCH et al., 2017; NANASAWA et al., 2017). Outros estudos consistentes sugerem que a QUE e a norquetiapina aumentam a inflamação periférica de baixo grau em pacientes esquizofrênicos (FOND et al., 2018). A terapia farmacológica desse antipsicótico também tem demonstrado cardiotoxicidade por infiltração inflamatória no tecido cardíaco e desenvolvimento de fibrose (LI et al., 2019).

Apesar dos relatos de neutropenia e agranulocitose causados pelo tratamento (ALMAGHREBI, 2019; PARK; KIM, 2016), não foi observada citotoxicidade direta em leucócitos e isolados de neutrófilos. Portanto, nessas células, a nmQUE pode envolver outras vias de ativação e/ou ação. Na formação de NETs observou-se que a nmQUE desencadeou uma maior formação das redes, tanto em neutrófilos não ativados, quanto em neutrófilos previamente ativados por exposição a leveduras inativas. Os resultados sugeriram que nmQUE pode induzir a formação de NETs ou aumentar a sensibilidade dos neutrófilos ativados pela presença de microrganismos, melhorando sua formação.

Os neutrófilos são as células que representam a primeira linha de defesa contra microorganismos invasores ou, possuem ação no reparo de lesões físicas. Vários microorganismos extracelulares e intracelulares induzem neutrófilos a extrudir NETs através do processo conhecido como NETosis (KOBAYASHI, 2015).

Esses resultados são de grande relevância, visto que a indução na formação das NETs sem a presença de microrganismos ou lesão física está associada a

patologias não infecciosas e imunomediadas, especialmente as de autoantígenos. Assim, têm-se associado à formação de NETs a diversas patologias como: o LES e a AR e também, o diabetes *mellitus* (JORCH; KUBES, 2017).

A maior formação das redes esta relacionada com complicações destas patologias, como é o caso da retinopatia (WANG et al., 2019) e a dificuldade na cicatrização de feridas (FADINI et al., 2016), ambas advindas do diabetes *mellitus*. Ainda, sabe-se que os pacientes autoimunes apresentam altos níveis de citocinas inflamatórias, o que leva a sensibilização dos neutrófilos para NETosis (KOBAYASHI, 2015).

Nesse contexto, é possível que a indução e sensibilização dos neutrófilos, na formação de NETs pela nmQUE, possa estar envolvida com o desenvolvimento de distúrbios metabólicos e morbidades, como o diabetes *mellitus* tipo 2 e a hipertrigliceridemia. Ainda, vale ressaltar que essa ação de indução e modulação na formação das redes não se mostra universal para os fármacos. Como exemplo disso, a hidralazina e a procainamida foram indutores de NETs, enquanto a clozapina, um antipsicótico, não mostrou-se indutor das NETs, diferentemente da nmQUE (IRIZARRY-CARO et al., 2018).

A ocorrência de neutropenia esta associada com a terapia psicofarmacológica da QUE, por abuso ou interação com outros medicamentos (ALMAGHREBI, 2019; HALABY; HADDAD, 2013; HUGHES, 2019; KLEIN-SCHWARTZ et al., 2014; PILGRIM; DRUMMER, 2013; RAHMAN et al., 2009), assim, hipoteticamente a formação de NETs por nmQUE aqui descrita, pode contribuir para esse efeito colateral clínico. Nesse caso, não podemos descartar que a nmQUE pode aumentar a estimulação da formação de NETs, mas também poderia desencadear um feedback positivo para a produção através da medula sanguínea de mais neutrófilos. Com isso, é evidente a forte relação do fármaco, estando na sua forma não metabolizada, com as vias da inflamação, num contexto geral sob a homeostase do organismo.

6 CONCLUSÃO

A partir dos resultados encontrados nesse estudo, concluímos que o fármaco apresentou grande capacidade de interação tanto com os macrófagos, quanto com os neutrófilos. Nos macrófagos mostrou-se com efeito dual, estando de maneira pró-inflamatória ou anti-inflamatória, de acordo com o estado da inicial da célula, não apresentando citotoxicidade na concentração de escolha. Já nos neutrófilos, a nmQUE pareceu induzir e até proporcionar o aumento da produção de NETs, o que pode contribuir para o desenvolvimento de efeitos colaterais e até mesmo, reações adversas. Assim, embora existam limitações metodológicas associadas aos estudos *in vitro*, os resultados aqui apresentados indicam que a nmQUE pode atuar de maneira direta na modulação das respostas do sistema imune inato. A realização de estudos *in vitro* que busquem elucidar as interações entre os transtornos neuropsiquiátricos e os processos inflamatórios são de grande relevância. Nesse contexto, espera-se que com avançar dos estudos haja maior entedimento da ação dos antipsicóticos, considerando todas as possíveis vias de atuação.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.K; LICHTMAN, A.H; PILLAI, S. **Cellular and molecular immunology**. 6ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2007.
- AL-AMIN, M.M.; REZA H.M. **Neuroinflammation: Contemporary anti-inflammatory treatment approaches**. Neurociências (Riyadh), v. 19, n. 2, p.87-92, 2014.
- ALCOCER-GÓMEZ, E. et al. **NLRP3 inflammasome is activated in mononuclear blood cells from patients with major depressive disorder**. Brain, Behavior, and Immunity, v. 36, p. 111-117, 2014.
- ALMAGHREBI, A.H. **Safety of a Clozapine Trial Following Quetiapine-Induced Leukopenia: A Case Report**. Current Drug Safety, v. 14, n. 1, p. 80-83, 2019.
- ALONSO-PEDRERO, L.; BES-RASTROLLO, M.; MARTI, A. **Effects of antidepressant and antipsychotic use on weight gain: A systematic review**. Obesity Reviews, v. 20, n.12, p. 1680-1690, 2019.
- ANDRADE, F. F. D.; PENAFORTE, C. L.; VELOSO, C.A. **Mecanismos moleculares de formação das armadilhas extracelulares dos neutrófilos e seu papel na imunidade inata**. Arquivos de Ciências da Saúde, v. 23, n. 2, p. 1-6, 2016.
- ANDREAZZA, A.C. et al. **Specific subcellular changes in oxidative stress in prefrontal cortex from patients with bipolar disorder**. Journal of Neurochemistry, v, 127, n. 4, p. 552-561, 2013.
- APEL, F.; ZYCHLINSKY, A.; KENNY, E.F. **The role of neutrophil extracellular traps in rheumatic diseases**. Nature Reviews Rheumatology, v. 14, n.8, p.467-475, 2018.
- ARNOLD, D.E; HEIMALL, J.R. **A Review of Chronic Granulomatous Disease**. Advances in Therapy, v. 34, n. 12, p. 2543–2557, 2017.
- ASSCHE, L. V. et al. **The neuropsychology and neurobiology of late-onset schizophrenia and very-late-onset schizophrenia-like psychosis: A critical review**. Neuroscience & Biobehavioral Reviews, v. 83, p. 604-621, 2017.
- AYTAR, M.H. et al. **The Effect of Quetiapine on Treatment of Experimental Acute Spinal Cord Injury**. Turk Neurosurg, v. 28, n. 1, p. 105–110, 2018.
- BARBISAN, F. et al. **Methotrexate – related response on human peripheral blood mononuclear cells may be modulated by the Ala16Val-SOD2 gene polymorphism**. Plos One, v. 9, n.10, p. 1-11, 2014.

- BARBISAN, F. et al. **The In Vitro Influence of a Genetic Superoxide-Hydrogen Peroxide Imbalance on Immunosenescence.** Rejuvenation Research, v. 20, n.4, p.334-345, 2017.
- BARBOSA, K.B.F. et al. **Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios.** Revista de Nutrição, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.
- BARRON, H. et al. **Neuroinflammation and Oxidative Stress in Psychosis and Psychosis Risk.** International Journal of Molecular Sciences, v. 18, n. 3, p. 651-663, 2017.
- BARTON, B.B. et al. **Prevalence of obesity, metabolic syndrome, diabetes and risk of cardiovascular disease in a psychiatric inpatient sample: results of the Metabolism in Psychiatry (MiP) Study.** European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience, p. 1-13, 2019.
- BAUNE, T. B.; EYRE, H. **Anti-inflammatory effects of antidepressant and atypical antipsychotic medication for the treatment of major depression and comorbid arthritis: a case report.** Journal Of Medical Case Reports, v. 4, n. 6, p. 1-4, 2010.
- BEHNEN, M. et al. **Extracellular Acidification Inhibits the ROS-Dependent Formation of Neutrophil Extracellular Traps.** Front. Frontiers in Immunology, v. 8, n.184, p.1-22, 2017.
- BENNETT, J. E. **NCD Countdown 2030: worldwide trends in non-communicable disease mortality and progress towards Sustainable Development Goal target 3.4.** Lancet, v. 392, n. 10152, p.1072-1088, 2018.
- BERGINK, V.; GIBNEY, S.M.; DREXHAGE, H.A. **Autoimmunity, inflammation, and psychosis: a search for peripheral markers.** Biological Psychiatry, v. 75, n. 4, p.324-331, 2014.
- BERNSTEIN, H. G. et al. **Glial cells as key players in schizophrenia pathology: recent insights and concepts of therapy.** Schizophrenia Research, v. 161, n.1, p. 4-18, 2014.
- BIAN, Q. et. al. **The effect of typical antipsychotics, perospiridone, ziprazidone and quetiapine on microglial activation induced by interferon – gamma.** Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry, v. 32, p. 42-48, 2008.
- BIANCHI, M. et al. **Restoration of NET formation by gene therapy in CGD controls aspergillosis.** Blood, v. 114, n. 13, p. 2619-2622, 2009.
- BORISSOFF, J.I. et al. **Elevated levels of circulating DNA and chromatin are independently associated with severe coronary atherosclerosis and a prothrombotic state.** Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, v.33, n. 8, p. 2032–2040, 2013.

BRASIL. Agência Nacional de Saúde Suplementar (ANS). **Diretrizes assistenciais em saúde mental na saúde suplementar**. Rio de Janeiro: ANS, 2008. 63.

Disponível em:

<http://www.ans.gov.br/images/stories/Plano_de_saude_e_Operadoras/Area_do_coonsumidor/diretrizes_assistenciais.pdf>. Acesso em: 01 Abr 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria da Vigilância em Saúde. **Boletim Epidemiológico: Prevalências de fatores de risco e de proteção: população adulta brasileira**, nº 12, v. 44. Brasília, 2015. 1-6 p. Disponível em:

<<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2014/junho/11/BE-2013-44--12---Vigitel.pdf>>. Acesso em: 06 Nov 2019.

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

http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/cadernos_atencao_basica_34_saude_mental.pdf>. Acesso em: 01 Dez 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Vigilância de Doenças Crônicas Não Transmissíveis (DCNT). Brasília**, 2015. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br/noticias/43036-sobre-a-vigilancia-de-dcnt>>. Acesso em: 20 Dez 2019.

BRETT, J. **Concerns about quetiapine**. Australian Prescriber, v. 38, n.3, p. 95-97, 2015.

BRINKMANN, V. et al. **Neutrophil extracellular traps kill bacteria**. Science, v. 5, n.303, p. 1532-1535, 2004.

BRUNE, B. et al. **Redox control of inflammation in macrophages**. Antioxidants and Redox Signaling, v.19, n.6, p.595-637, 2013.

BRUNTON, L.L.; LAZO, J.S.; PARKER, K.L. **Goodman e Gilman – As bases farmacológicas da terapêutica**. 11 ed. Porto Alegre: McGraw- Hill, 2010.

CARR, Z.J. et al. **In a Model of Neuroinflammation Designed to Mimic Delirium, Quetiapine Reduces Cortisol Secretion and Preserves Reversal Learning in the Attentional Set Shifting Task**. Journal Neuroimmune Pharmacology, v. 14, n. 3, p. 383–390, 2019.

CASTANHEIRA, F.V. S.; KUBES, P. **Neutrophils and NETs in modulating acute and chronic inflammation**. Blood, v. 133, n. 20, p. 2178-2185, 2019.

CHEN, A.T.; NASRALLAH, H.A. **Neuroprotective effects of the second generation antipsychotics**. Schizophrenia Research, v. 208, p.1-7, 2019.

CHEN, Y.R. et al. **Effectiveness of quetiapine for poststroke pathological laughing: case report and review of the literature**. Clinical Neuropharmacology, v.33, n. 6, p. 319-322, 2010.

CHERRY, J.D.; OLSCHOWKA, J.A.; O'BANION, M.K. **Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed.** Journal of Neuroinflammation, v. 11, n. 98, p. 1-15, 2014.

CHIAPPONI, C. et al. **GABA system in schizophrenia and mood disorders: A mini review on third – generation imaging studies.** Frontiers in Psychiatry, v. 7, n.61, p. 1-10, 2016.

CLARK, S.R. et al. **Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood.** Nature Medicine, v. 13, n. 4, p. 463-469, 2007.

CORBANEZI, E. **Depressive disorders and contemporary capitalism.** Caderno CRH. v. 31, n. 83, p. 1-20, 2018.

COWLAND, J.B.; BORREGAARD, N. **Granulopoiesis and granules of human neutrophils.** Immunological Reviews, v. 273, n. 1, p. 11- 28, 2016.

CRUVINEL, W. M. et al. **Sistema Imunitário: Parte I – Fundamentos da Imunidade Inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória.** Revista Brasileira de Reumatologia, v. 50, n. 4, p. 434-447, 2010.

DE BUHR, N.; VON KÖCKRITZ-BLICKWEDE, M. **How Neutrophil Extracellular Traps Become Visible.** Journal of Immunology Research, v. 2016, n. 4604713, p.1-13, 2016.

DEVANE, C.L.; NEMEROFF, C.B. **Clinical pharmacokinetics of quetiapine: an atypical antipsychotic.** Clinical Pharmacokinetics, v. 40, n. 7, p. 509-522, 2001.

DOUDA, D.N. et al. **SK3 channel and mitochondrial ROS mediate NADPH oxidase-independent NETosis induced by calcium influx.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 112, n. 9, p. 2817–2822, 2015.

DOUDA, D.N. et al. **Akt is essential to induce NADPH-dependent NETosis and to switch the neutrophil death to apoptosis.** Blood, v. 123, n. 4, p. 597-600, 2014.

DUARTE, T. et al. **The Influence of a Xanthine-Catechin Chemical Matrix on in vitro Macrophage-Activation Triggered by Antipsychotic Ziprasidone.** Inflammation, v. 42, n. 3, p. 915-925, 2019.

FADINI, G. P. et al. **NETosis Delays Diabetic Wound Healing in Mice and Humans.** Diabetes, v. 65, n.4, p.1061-1071, 2016.

FENN, A.M. et al. **Lipopolysaccharide-induced interleukin (IL)-4 receptor- α expression and corresponding sensitivity to the M2 promoting effects of IL-4 are impaired in microglia of aged mice.** Brain Behavior and Immunity, v. 26, n. 5, p. 766-777, 2012.

FERNANDES, M. S. et al. **Lithium is able to minimize olanzapine oxidative-inflammatory induction on macrophage cells.** PLoS One, v.14, n.1, p. 1-16, 2019.

FLESHNER, M.; FRANK, M.; MAIER, S.F. **Danger Signals and Inflammasomes: Stress-Evoked Sterile Inflammation in Mood Disorders.**

Neuropsychopharmacology, v. 42, n.1, p. 36-45, 2017.

FOND, G. et al. **Relationships between low-grade peripheral inflammation and psychotropic drugs in schizophrenia: results from the national FACE-SZ cohort.** European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience, v. 286, n.6, p. 541-553, 2018.

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.

FRANCO, J.M.; VALLABHAJOSYULA, S.; GRIFFIN, T.J. **Quetiapine-induced hypertriglyceridaemia causing acute pancreatitis.** BMJ Case Reports, p. 1-3, 2015.

FREILICH, R.W.; WOODBURY, M. E.; IKEZU, T. **Integrated expression profiles of mRNA and miRNA in polarized primary murine microglia.** PLoS One, v. 8, n. 11, p. 1-15, 2013.

FUCHS, T. A. et al. **Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps.** Journal of Cell Biology, v. 176, n. 2, p. 231-241, 2007.

FULLERTON, J. N.; GILROY, D. W. **Resolution of inflammation: a new therapeutic frontier.** Nature Reviews. Drug. Discovery, v. 15, n. 8, p. 551-567, 2016.

GALLING, B; CORRELL, C.U. **Do antipsychotics increase diabetes risk in children and adolescents?.** Expert Opinion on Drug Safety, v. 14, n. 2, p. 219-241, 2015.

GANESAN, K.; XU, B. **Polyphenol-Rich Dry Common Beans (*Phaseolus vulgaris L.*) and Their Health Benefits.** International Journal of Molecular Sciences, v. 18, n.11, p. 1-41, 2017.

GARCIA-ROMO, G. S. et al. **Netting neutrophils are major inducers of type I IFN production in pediatric systemic lupus erythematosus.** Science Translational Medicine, v. 3, n. 73, p. 1-20, 2011.

GLOCKER, C.; GROHMANN, R.; SCHULZ, H. **Fatal Agranulocytosis Associated With Quetiapine in Monotherapy: A Case Report.** Journal of Clinical Psychopharmacology, v. 37, n. 5, p. 625-627, 2017.

GRANGER, V.; DE CHAISEMARTIN, L.; CHOLLET-MARTIN, S. **Miraculous catch by neutrophils NETs.** Medicine Sciences (Paris), v. 30, n. 5, p.544-549, 2014.

GROVER, M. et al. **Atypical antipsychotic quetiapine in the management of severe refractory functional gastrointestinal disorders.** Digestive Diseases Sciences, v. 54, n. 6, p. 1284–1291, 2009.

GROVER, S. et al. **Factor analysis of symptom dimensions (psychotic, affective and obsessive compulsive symptoms) in schizophrenia.** Asian Journal of Psychiatry, v. 38, p. 72-77, 2018.

HALABY, A.; HADDAD, R.; NAJA, W. J. **Hyperammonemia induced by interaction of valproate and quetiapine.** Current Drug Safety, v. 8, n. 4, p. 284-286, 2013.

HAN, J.H. et al. **Quetiapine mitigates the ethanol-induced oxidative stress in brain tissue, but not in the liver, of the rat.** Neuropsychiatric Diseases and Treatment, v. 11, p. 1473–1482, 2015.

HARDAN, A.Y; JOU, R.J; HANDEN, B.L. **Retrospective study of quetiapine in children and adolescents with pervasive developmental disorders.** Journal of Autism and Developmental Disorders, v. 35, n. 3, p. 387–391, 2005.

HASNAIN, M. **Genetic vulnerability in antipsychotic drug-induced diabetes.** Lancet Psychiatry, v. 2, n. 12, p. 1049-1051, 2015.

HAWKINS, S.B.; BUCKLIN, M.; MUZYK, A.J. **Quetiapine for the treatment of delirium.** Journal of Hospital Medicine, v. 8, n. 4, p. 215-220, 2013.

HEFNER, G. et al. **Inflammation and psychotropic drugs: the relationship between C-reactive protein and antipsychotic drug levels.** Psychopharmacology, v. 233, n. 9, p.1695-1705, 2016.

HEO, M. H. **Analgesic effect of quetiapine in a mouse model of cancer-induced bone pain.** Korean Journal of Internal Medicine, v. 32, n. 6, p.1069–1074, 2017.

HIRSCH, L. et al. **Second-Generation Antipsychotics and Metabolic Side Effects: A Systematic Review of Population-Based Studies.** Drug Safety, v. 40, n.9, p. 771-781, 2017.

HOWES, O.D; MCCUTCHEON, R. **Inflammation and the neural diathesis-stress hypothesis of schizophrenia: a reconceptualization.** Translational Psychiatry, v. 7, n. 2, p.1013-1024, 2017.

HUGHES, R. L. **Fatal combination of mitragynine and quetiapine - a case report with discussion of a potential herb-drug interaction.** Forensic Science, Medicine and Pathology, v. 15, n. 1, p. 110-113, 2019.

HUSNAIN, M. et al. **Quetiapine Associated Thrombotic Thrombocytopenic Purpura: A Case Report and Literature Review.** American Journal of Therapeutics, v. 24, n. 5, p. 615-616, 2017.

HUSSAIN, T. et al. **Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us?**. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2016, n. 7432797, p. 1- 9, 2016.

IRIZARRY-CARO, J. A. et al. **Brief Report: Drugs Implicated in Systemic Autoimmunity Modulate Neutrophil Extracellular Trap Formation**. *Arthritis and Rheumatology*, v. 70, n. 3. p. 468-474, 2018.

JABLONSKA, J.; GRANOT, Z. **Neutrophil, quo vadis?**. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 102, n. 3, p. 685-688, 2017.

JAEHNE, E.J. et al. **The effect of the antipsychotic drug quetiapine and its metabolite norquetiapine on acute inflammation, memory and anhedonia**. *Pharmacology, Biochemistry Behavior*, v. 135, p.136-44, 2015.

JEON, S.W; KIM, Y.K. **Inflammation-induced depression: Its pathophysiology and therapeutic implications**. *Journal of Neuroimmunology*, v. 313, p. 92-98, 2017.

JONES, E.M.; COCHRANE, C.A.; PERCIVAL, S.L. **The Effect of pH on the Extracellular Matrix and Biofilms**. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, v. 4, n. 7, p.431-439, 2015.

JORCH, S.K.; KUBES, P.; **An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease**. *Nature Medicine*, v. 23, n. 3, p. 279-287, 2017.

JUNQUEIRA, J. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 12. Ed. Guanabara Koogan, 2013.

KAPLAN, M.J.; RADIC, M.; **Neutrophil extracellular traps: Double-edged swords of innate immunity**. *Journal of Immunology*, v. 189, n. 6, p. 2689-2695, 2012.

KHAN, M. A.; PALANIYAR, N. **Transcriptional firing helps to drive NETosis**. *Scientific Reports*, v. 7, n. 41749, p. 1-16, 2017.

KHAN, M.A. et al. **JNK Activation Turns on LPS- and Gram-Negative Bacteria-Induced NADPH Oxidase-Dependent Suicidal NETosis**. *Scientific Reports*, v. 7, n. 3409, p. 1-16, 2017.

KHANDPUR, R et al. **NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis**. *Science Translational Medicine*, v. 5, n. 178, p. 1-23, 2013.

KIM, H. et al. **Anti-inflammatory effect of quetiapine on collagen-induced arthritis of mouse**. *European Journal of Pharmacology*, v. 5, n. 678, p. 55-60, 2012.

KLEIN-SCHWARTZ, W.; SCHWARTZ, E.K.; ANDERSON, B.D. **Evaluation of quetiapine abuse and misuse reported to poison centers**. *Journal of Addiction Medicine*, v. 8, n. 3, p. 195-198, 2014.

- KOBAYASHI, Y. **Neutrophil biology: an update.** Journal Experimental and Clinical Sciences, v. 14, p. 220-227, 2015.
- KOLACZKOWSKA, E.; KUBES, P. **Neutrophil recruitment and function in health and inflammation.** Nature Reviews Immunology, v. 13, n. 3, p. 159-175, 2013.
- KUBES, P. **The enigmatic neutrophil: what we do not know.** Cell and Tissue Research, v. 371, n. 3, p. 399-406, 2018.
- LACKEY, D. E.; OLEFSKY, J. M. **Regulation of metabolism by the innate immune system.** Nature Reviews Endocrinology, v. 12, n. 1, p.15- 28, 2015.
- LALLY, J.; MACCABE, J.H. **Antipsychotic medication in schizophrenia: a review.** British Medical Bulletin, v. 114, n. 1, p.169-179, 2015.
- LEZA, J. C. et al. **Inflammation in schizophrenia: A questin of balance.** Neuroscience and Biobehavioral Reviews, v. 55, p. 612–626, 2015.
- LI, Y. et al. **Characterization and biological significance of IL-23-induced neutrophil polarization.** Cellular and Molecular Immunology, v. 15, n. 5, p. 518–530, 2018.
- LI, Y. et al. **Reciprocal regulation between resting microglial dynamics and neuronal activity in vivo.** Developmental Cell, v. 23, n. 6, p. 1189–1202, 2012.
- LI, X. et al. **Quetiapine induces myocardial necroptotic cell death through bidirectional regulation of cannabinoid receptors.** Toxicology Letters, v.313, p.77-90, 2019.
- LI, X.; CAMERON, M.D. **Potential role of a quetiapine metabolite in quetiapine-induced neutropenia and agranulocytosis.** Chemical Research in Toxicology, v.25, n. 5, p. 1004-1011, 2012.
- LIEW, P.X.; KUBES, P. **The Neutrophil's Role During Health and Disease.** Physiological Reviews, v. 99, n. 2, p. 1223-1248, 2019.
- LOOD, C. et al. **Neutrophil extracellular traps enriched in oxidized mitochondrial DNA are interferogenic and contribute to lupus-like disease.** Nature Medicine, v.22, p. 146–153, 2016.
- LUCCHESI, R. et al. **Factors associated with the probability of common mental disorders in pregnant women: a cross-sectional study.** Anna Nery School, v.21, n.3, p. 1-6, 2017.
- MA, L. et al. **Quetiapine attenuates cognitive impairment and decreases seizure susceptibility possibly through promoting myelin development in a rat model of malformations of cortical development.** Brain Research, v, 1622, p. 443–451, 2015.

MANFREDI, A. A. et al. **The Neutrophil's Choice: Phagocytose vs Make Neutrophil Extracellular Traps**. *Frontiers in Immunology*, v.9, n. 288, p.1-13, 2018.

MANTERE, O. et al. **Immunomodulatory effects of antipsychotic treatment on gene expression in first-episode psychosis**. *Journal of Psychiatric Research*, v.109, p.18-26, 2019.

MARRERO, S.; ADASHI, E.Y. **Noncommunicable diseases**. *Seminars in Reproductive Medicine*, v. 33, n.1, p. 35- 40, 2015.

MILLER, A.H.; RAISON, C.L. **The role of inflammation in depression: from evolutionary imperative to modern treatment target**. *Nature Reviews Immunology*, v. 16, n. 1, p. 22-34, 2016.

MONTAGNER, G. F. S. **Efeito *in vitro* do polimorfismo Ala16Val do gene as superóxido dismutase dependente de manganês no metabolismo oxidativo de linfócitos**, p. 68, Dissertação (Mestrado em Bioquímica Toxicológica) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2010. Disponível em: <<https://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/11126/MONTAGNER%2c%20GREICE%20FRANCIELE%20FEYH%20DOS%20SANTOS.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em: 20 Nov 2019.

MONTEBELLO, M.E.; BRETT, J. **Misuse and Associated Harms of Quetiapine and Other Atypical Antipsychotics**. *Current Topics in Behavioral Neurosciences*, v. 34, p. 125-139, 2017.

MÜLLER, N. et al. **Anti-inflammatory treatment in schizophrenia**. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, v.42, p.146-153, 2012.

NAFFAH, C. S. **Alkaline pH Promotes NADPH Oxidase-Independent Neutrophil Extracellular Trap Formation: A Matter of Mitochondrial Reactive Oxygen Species Generation and Citrullination and Cleavage of Histone**. *Frontiers Immunology*, v. 8, n.1849, p. 1-15, 2017.

NANASAWA, H. et al. **Development of diabetes mellitus associated with quetiapine: A case series**. *Medicine (Baltimore)*, v. 96, n. 3, p. 1-6, 2017.

NIKIFORUK, A. **Quetiapine ameliorates stress-induced cognitive inflexibility in rats**. *Neuropharmacology*, v. 64, p. 357–364, 2013.

OLTEN, B.; BLOCH, M.H. **Meta regression: Relationship between antipsychotic receptor binding profiles and side-effects**. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, v. 8, n. 84, p. 272-281, 2018.

ORIHUELA, R.; MCPHERSON, C.A.; HARRY, G.J. **Microglial M1/M2 polarization and metabolic states**. *British Journal of Pharmacology*, v. 173, n. 4, p. 649-665, 2016.

OWEN, M.J; SAWA, A; MORTENSEN, P.B. **Schizophrenia**. *Lancet*, v. 388, n.10039, p. 86-97, 2016.

PAN, Y.J. et al. **Quetiapine ameliorates collagen-induced arthritis in mice via the suppression of the AKT and ERK signaling pathways**. *Inflammation Research*, v.67, n. 10, p. 847–861, 2018.

PAPAYANNOPOULOS, V. **Neutrophil extracellular traps in immunity and disease**. *Nature Reviews Immunology*, v.18, n. 2, p. 134-147, 2018.

PAPAYANNOPOULOS, V.; STAAB, D; ZYCHLINSKY, A. **Neutrophil elastase enhances sputum solubilization in cystic fibrosis patients receiving DNase therapy**. *PLoS One*, v. 6, n.12, p. 1-7, 2011.

PARK, H.J; KIM, J.Y. **Incidence of Neutropenia With Valproate and Quetiapine Combination Treatment in Subjects With Acquired Brain Injuries**. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*, v. 97, n. 2, p. 183-188, 2016.

PARKER, H. et al. **Requirements for NADPH oxidase and myeloperoxidase in neutrophil extracellular trap formation differ depending on the stimulus**. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 92, n. 4, p. 841-849, 2012.

PÁRRAGA, H.C et al. **Quetiapine treatment of children with Tourette's syndrome: report of two cases**. *Journal of Child and Adolescent Psychopharmacology*, v. 11, n. 2, p. 187-191, 2001.

PASQUALI, M. A. **A longitudinal study of neurotrophic, oxidative, and inflammatory markers in first-onset depression in midlife women**. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, v. 268, n. 8, p. 771-781, 2018.

PERL, A. **Oxidative stress in the pathology and treatment of systemic lúpus erythematosus**. *Nature Reviews Rheumatology*, v. 9, n. 11, p. 674–686, 2013.

PIENKOS, E. et al. **Hallucinations Beyond Voices: A Conceptual Review of the Phenomenology of Altered Perception in Psychosis**. *Schizophrenia Bulletin*, v.45, n. 1, p. 67-77, 2019.

PIETERSE, E. et al. **Neutrophils Discriminate between Lipopolysaccharides of Different Bacterial Sources and Selectively Release Neutrophil Extracellular Traps**. *Frontiers in Immunology*, v. 7, n. 484, p. 1-13, 2016.

PIETERSE, E. et al. **Cleaved N-terminal histone tails distinguish between NADPH oxidase (NOX)-dependent and NOX-independent pathways of neutrophil extracellular trap formation**. *Annals of the Rheumatic Diseases*, v. 77, n. 12, p. 1790-1798, 2018.

PILGRIM, J.L; DRUMMER, O.H. **The toxicology and comorbidities of fatal cases involving quetiapine**. *Forensic Science, Medicine and Pathology*, v. 9, n. 2, p. 170-176, 2013.

QUENTMEIER, H. et al. **Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: inhibitor of tumor necrosis factor-induced apoptosis.** *Leukemia Research*, v. 27, n. 6, p. 539-545, 2003.

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.

RAHMAN, A. et al. **Evaluating the incidence of leukopenia and neutropenia with valproate, quetiapine, or the combination in children and adolescents.** *Annals of Pharmacotherapy*, v. 43, n. 5, p. 822-830, 2009.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. **Farmacologia.** 8ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

RAVINDRAN, M.; KHAN, M. A.; PALANIYAR, N. **Neutrophil Extracellular Trap Formation: Physiology, Pathology, and Pharmacology.** *Biomolecules*, v. 9, n. 8, p. 1-15, 2019.

ROBINSON, B.D. et al. **Quetiapine protects the blood-brain barrier in traumatic brain injury.** *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, v. 85, n.5, p. 968-976, 2018.

RODRÍGUEZ-ESPINOSA, O. **Metabolic requirements for neutrophil extracellular traps formation.** *Immunology*, v. 145, n. 2, p. 213-224, 2015.

ROITT, I.M. et al. **Fundamentos de Imunologia.** 12. ed. Guanabara Koogan, 2014.

ROSENBLAT, J.D. et al. **Anti-inflammatory agents in the treatment of bipolar depression: a systematic review and meta-analysis.** *Bipolar Disorders*, v. 18, n. 2, p. 89-101, 2016.

SANTOS, E.G. D; SIQUEIRA, M.M. **Prevalência dos transtornos mentais na população adulta brasileira: uma revisão sistemática de 1997 a 2009.** *Jornal Brasileiro de Psiquiatria*, v. 59, n. 3, p. 1-9, 2010.

SCHMITT, U.; FALKAI, P. **The neuropathology of schizophrenia: new insights from postmortem studies.** *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, v. 264, n. 4, p. 269-70, 2014.

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

SIES, H. **Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine.** *Redox Biology*, v.4, p.180-183, 2015.

SIES, H. **On the history of oxidative stress: Concept and some aspects of current development.** *Current Opinion in Toxicology*, v. 7, p. 122-126, 2018.

SOUZA, M.B.R. **Análise genética de novos potenciais polimorfismos de risco em transtornos de humor e utilização de abordagens computacionais em busca de genes candidatos a Doença de Alzheimer.** 2013. 97f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, 2013.

STAHL, S.M. **Psicofarmacologia: bases neurocientíficas e aplicações práticas.** Tradução Patricia Lydie Voeux; revisão técnica Irismar Reis de Oliveira. – 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.

SUR CHOWDHURY, C. et al. **Enhanced neutrophil extracellular trap generation in rheumatoid arthritis: analysis of underlying signal transduction pathways and potential diagnostic utility.** Arthritis Research and Therapy, v.16, n. 3, p. 1-14, 2014.

SUTTAJIT, S. et al. **Quetiapine for acute bipolar depression: a systematic review and meta-analysis.** Drug Design, Development and Therapy, v. 8, p. 827-38, 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.

TAKEI, H. et al. **Rapid killing of human neutrophils by the potent activator phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) accompanied by changes different from typical apoptosis or necrosis.** Journal of Leukocyte Biology, v. 59, n. 2, p. 229-240, 1996.

TOMITA, T. et al. **Leukocytopenia in patients treated with multiple antipsychotics, including aripiprazole and quetiapine.** Psychiatry and Clinical Neurosciences, v. 7, n.1, p. 71-72, 2017.

URBAN, C. F. et al. **A Neutrophil extracellular traps capture and kill Candida albicans yeast and hyphal forms.** Cellular Microbiology, v. 8, n. 4, p. 668-676, 2006.

VAKILIAN, A. et al. **Vitamin B12 in Association with Antipsychotic Drugs Can Modulate the Expression of Pro-/Anti-Inflammatory Cytokines in Alzheimer Disease Patients.** Neuroimmunomodulation, v. 24, n. 6, p. 310–319, 2017.

VEDANA, K.G.G. et al. **Agindo Em Busca De Alívio: Enfrentamento Da Esquizofrenia E Dos Incômodos Ocasionados Pelo Tratamento Medicamentoso.** Ciência, Cuidado e Saúde, v. 12, n. 2, p. 365-374, 2013.

VITALE, G.; SALVIOLI, S.; FRANCESCHI, C. **Oxidative stress and the ageing endocrine system.** Nature Reviews Endocrinology, v. 9, p. 228-240, 2013.

VON VIETINGHOFF, S.; LEY, K. **Homeostatic regulation of blood neutrophil counts.** Journal of Immunology v. 181, n. 8, p. 5183-5188, 2008.

- WANG, K. et al. **Quetiapine Attenuates the Neuroinflammation and Executive Function Deficit in Streptozotocin-Induced Diabetic Mice**. *Mediators of Inflammation*, v. 2019, n. 1236082, p. 1-8, 2019.
- WANG, X.; YOUSEFI, S.; SIMON, H.U. **Necroptosis and neutrophil-associated disorders**. *Cell Death and Disease*, v. 9, n. 2, p. 1-9, 2018.
- WANG, Y. et al. **Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation**. *Journal of Cell Biology*, v. 184, n. 2, p. 205-213, 2009.
- WANG, Y. **Human PAD4 Regulates Histone Arginine Methylation Levels via Demethyliminination**. *Science*, v. 306, n. 564, p. 279-283, 2004.
- WARNATSCH, A. et al. **Inflammation. Neutrophil extracellular traps license macrophages for cytokine production in atherosclerosis**. *Science*, v. 349, n. 6245, p. 316-320, 2015.
- WOLF, S. A.; BODDEKE, H.W.; KETTENMANN, H. **Microglia in Physiology and Disease**. *Annual Review of Physiology*, v.79, p. 619-643, 2017.
- WONG, S.L. et al. **Diabetes primes neutrophils to undergo NETosis, which impairs wound healing**. *Nature Medicine*, v. 21, n. 7, p. 815-819, 2015.
- XIAO, X.; CHANG, C. **Diagnosis and classification of drug-induced autoimmunity (DIA)**. *Journal of Autoimmunity*, v. 48-49, p. 66-72, 2014.
- YANG, H. et al. **New Insights into Neutrophil Extracellular Traps: Mechanisms of Formation and Role in Inflammation**. *Frontiers in Immunology*, v. 7, n. 302, p. 1-28, 2016.
- YIPP, B.G. et al. **Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo**. *Nature Medicine*, v. 18, n. 9, p. 1386-1393, 2012.
- YIPP, B.G.; KUBES, P. **NETosis: How vital is it?**. *Blood*, v. 122, n.16, p. 2784–2794, 2013.
- YOUSEFI, S. et al. **Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps**. *Cell Death & Differentiation*, v. 16, n. 11, p. 1438-1444, 2009.
- ZHANG, J.; BUTTERFIELD, D.A. **Oxidative stress and neurodegeneration**. *Brain Research Bulletin*, v. 133, p. 1-3, 2017.
- ZHORNITSKY, S. et al. **Predictors of community functioning in schizophrenia and substance use disorder patients**. *Community Mental Health Journal*, v. 49, n. 3, p. 317-322, 2012.

ANEXO A – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO MANUSCRITO

Psychopharmacology em Editorial Manager 

HOME • LOGOUT • HELP • REGISTER • UPDATE MY INFORMATION • JOURNAL OVERVIEW
 MAIN MENU • CONTACT US • SUBMIT A MANUSCRIPT • INSTRUCTIONS FOR AUTHORS • PRIVACY

Role: Username: Ivanada Cruz

Submissions Being Processed for Author Ivana Beatrice Manica da Cruz, PhD

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display results per page.

 Action 	Manuscript Number 	Title 	Initial Date Submitted 	Status Date 	Current Status 
Action Links	PSPH-D-20-00004	Unmetabolized-Quetiapine has in vitro effect on innate immune cells by modulation of inflammatory response and neutrophil extracellular traps (NETs) formation	05 Jan 2020	05 Jan 2020	New Submission

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display results per page.

<< Author Main Menu