

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

**EFEITO *IN VITRO* DO HALOPERIDOL E
RISPERIDONA NA ATIVAÇÃO INFLAMATÓRIA DE
MACRÓFAGOS RAW 264.7**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Ivo Emílio da Cruz Jung

**Santa Maria, RS, Brasil
2015**

**Efeito *in vitro* do haloperidol e risperidona na ativação
inflamatória de macrófagos RAW 264.7**

Ivo Emílio da Cruz Jung

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Farmacologia do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia (PPGF), Área de Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de

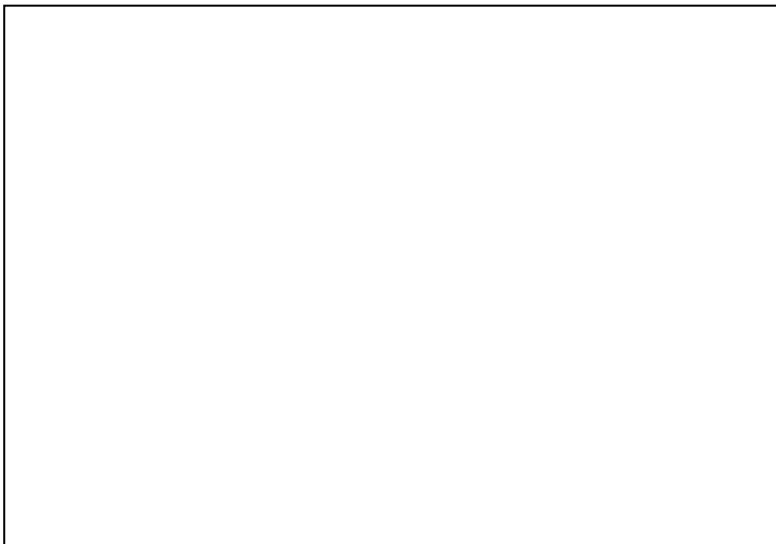
Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Noal Moresco
Co-orientadora: Marta Maria Medeiros Frescura Duarte

Santa Maria, RS, Brasil

2015

Ficha catalográfica



Ficha catalográfica elaborada por
Biblioteca Central da UFSM

© 2015

Todos os direitos autorais reservados a Ivo Emilio da Cruz Jung. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

Endereço: Rua Doze, n. 2010, Bairro da Luz, Santa Maria, RS. CEP:97110-680

Fone: (055)5532225678; Fax: (055)5532251144; E-mail: ufesme@ct.ufsm.br

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia**

A Comissão Avaliadora, abaixo assinada, Aprova a Dissertação de Mestrado

**EFEITO *IN VITRO* DO HALOPERIDOL E RISPERIDONA NA
ATIVÇÃO INFLAMATÓRIA DE MACRÓFAGOS RAW 264.7**

elaborada por
Ivo Emilio da Cruz Jung

Como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Farmacologia

COMISSÃO EXAMINADORA

**Marta Medeiros Frescura Duarte
(Co-orientadora)**

Liliane Bauermann, Dr^a. (UFSM)

Marco Aurélio Echart Montano, Dr. (UNOESC)

Santa Maria, 10 de abril de 2015

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos que me auxiliaram na realização do meu mestrado em especial:

- ao meu orientador, Prof. Dr. Rafael Noal Moresco por todo apoio e disposição em me auxiliar e me apoiar ao longo do curso de mestrado e realização da dissertação;
- a minha co-orientadora Prof.Dra. Marta Maria Medeiros Frescura Duarte por todo auxílio, em especial nas dosagens das citocinas;
- a Profa.Dra Ivana Beatrice Mânica da Cruz, coordenadora do Laboratório de Biogenômica (UFSM) onde foram realizadas as culturas de células deste trabalho;
- ao meus queridos colegas e amigos Alencar Kolinski Machado, Fernanda Barbisan e Verônica Azzolin do Laboratório de Biogenômica (UFSM), pelo auxílio inestimável para a realização dos testes laboratoriais;
- ao Laboratório BioRep da UFSM por terem disponibilizado o uso de equipamentos para análises moleculares realizadas;
- aos meus pais (biológicos e emprestados: Ivana e Eduardo, Nestor e Tânia), avós (Albano, Ana, Ivo (*in memorian*) e Beatriz), aos meus tios, primos e meus irmãos: Ronald, Pedro, Henrique e Felipe;
- a todos os meus amigos, especialmente a “gurizada do RPG”, que sempre ajudaram a preservar minha sanidade durante tempos de estresse;
- ao Dr. Carlos Petri e Dra. Fátima Plein por todo o incentivo e presença constante na minha vida profissional como psicólogo;
- ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) pelos recursos financeiros que possibilitaram a realização das pesquisas laboratoriais;
- aos professores e funcionários do Programa de Pós- graduação Farmacologia pelo apoio e aprendizagem.

EPÍGRAFE

“Sorte é para quem precisa de eventos aleatórios para atingir seus objetivos. Com esforço, persistência e tolerância se consegue, mesmo quando os eventos aleatórios não estão a seu favor”

Ivo Emílio da Cruz Jung

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós Graduação em Farmacologia
Universidade Federal de Santa Maria

EFEITO *IN VITRO* DO HALOPERIDOL E RISPERIDONA NA ATIVAÇÃO INFLAMATÓRIA DE MACRÓFAGOS RAW 264.7

Autor: Ivo Emilio da Cruz Jung
Orientador: Prof. Dr. Rafael Noal Moresco
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 10 de abril de 2015

Introdução: Fármacos antipsicóticos, como o haloperidol (típico) e a risperidona (atípico) quando utilizados por muito tempo podem aumentar o risco de obesidade e de outras disfunções endócrinas em pacientes psiquiátricos. Existem algumas evidências que sugerem que estes fármacos possuem efeito pró-inflamatório, o que contribuiria para o estabelecimento destes distúrbios. Entretanto, os resultados obtidos até o presente momento são bastante contraditórios. Por este motivo, investigações em células isoladas do sistema imune que estão diretamente envolvidas com o processo inflamatório são relevantes. **Objetivos:** O presente estudo teve como objetivo principal investigar o efeito *in vitro* de três concentrações de haloperidol e risperidona (20, 30 e 40 μM) na ativação de macrófagos da linhagem RAW 264.7 através da análise de padrões de alteração morfológica celular, níveis de óxido nítrico, viabilidade 24, 48 e 72 h após a exposição, indução a apoptose e produção de citocinas inflamatórias e pró-inflamatórias. **Métodos:** A cultura dos macrófagos foi realizada em meio RPMI 1640, suplementado com 10% de soro bovino fetal e 1% antibióticos, em estufa de CO_2 (5%) a 37°C. Os níveis de óxido nítrico foram determinados por técnica de Griess modificada que mede a taxa de nitrito/nitrato por espectrofotometria; a viabilidade celular foi determinada pelo ensaio espectrofotométrico do MTT; a apoptose foi analisada por citometria de fluxo com marcação celular da anexina V e iodeto de propídio. Análise da expressão do gene anti-apoptótico Bcl-2 e pró-apoptótico BAX foi realizada via QT-PCR bem como a quantificação das caspases 3 e 8 foi realizada através da técnica de imunoenensaio ELISA. Os tratamentos foram comparados por análise de variância de uma via seguida de teste post hoc de Tukey ou de Dunnett, através do Software Graph Pad Prism 5.0. **Resultados:** Macrófagos expostos a diferentes concentrações de haloperidol e risperidona apresentaram aumento nos níveis de óxido nítrico, alterações morfológicas e diminuição na viabilidade após 24, 48 e 72 h de exposição. Os níveis de células em apoptose inicial foram significativamente mais elevados em células tratadas com haloperidol (40 μM) e em todos os tratamentos com risperidona após 24 horas de exposição. A razão Bcl-2/BAX foi menor que 1 em células tratadas com os fármacos antipsicóticos indicando indução apoptótica. Os níveis de caspases 3 e 8 também se elevaram de um modo dose-dependente. Os níveis de citocinas inflamatórias aumentaram em todos os tratamentos (IL-1 β , IL-6, TNF α , INF γ) enquanto os níveis de IL-10, que é uma citocina anti-inflamatória diminuíram. **Conclusão:** O conjunto dos resultados sugere que o haloperidol e risperidona agem diretamente sobre os macrófagos e que podem exacerbar processos inflamatórios. A ação no metabolismo inflamatório destes fármacos parece influenciar no desenvolvimento da obesidade de pacientes que usam estes medicamentos por um longo tempo.

Palavras chave: Antipsicóticos, Inflamação, Macrófagos, Apoptose, Citocinas

ABSTRACT

Master of Sciences
Programa de Pós Graduação em Farmacologia
Universidade Federal de Santa Maria

EFEITO *IN VITRO* DO HALOPERIDOL E RISPERIDONA NA ATIVAÇÃO INFLAMATÓRIA DE MACRÓFAGOS RAW 264.7

Advisor: Prof. Dr. Rafael Noal Moresco

Date and place of the defense: Santa Maria, April 10, 2015.

Introduction: Antipsychotic drugs, such as haloperidol (typical) and risperidone (atypical) increase the risk of obesity and other endocrine disturbs in psychiatric patients when used in long term treatments. There is some evidence that suggest that the proinflammatory effect of these drugs could contribute to the stablishement of these morbidities. However, the results obtained until now are contradictory. For this reason, investigaions using isolated cells from the immune system that are directly involved with inflammatory procecsss are considered relevant. **Objective:** The present study investigated the *in vitro* effect of three haloperidol and risperidone concentrations (20, 30 e 40 μ M) on RAW 264.7 cell line macrophages for analysis of morphological pattern, oxide nitric levels, cell viability (24, 48 and 72 h), apoptosis induction and cytokine production. **Methods:** Macrophage cell culture was made in RPMI 1640 medium, 10% fetal bovine serum, 1% antibiotics in CO₂ % incubator at 37°C. The nitric oxide (NO) levels were determined by Griess assay modified to measure nitrite/nitrate ratio by spectrophotometry. Apoptosis was determined by flow cytometry using Annexin V and iodide propidium as cell markers. Gene expression analysis of Bcl-2 and BAX genes were performed by QT-PCR was well as quantification of caspases 8 and 3 levels were performed by ELISA immunoassay. Treatments were compared by One-way analysis of variance followed by Tukey or Dunnet post hoc test. **Results:** Macrophages exposed to different concentrations of haloperidol and risperidone presented increased NO levels, morphological alterations as well as decrease in viability after 24, 48 and 72 h of exposition. The apoptosis level of cells was significantly higher than untreated cells when macrophages were exposed to haloperidol (40 μ M) and all treatments with risperidone after 24 h exposition. Bcl-2/BAX ratio gene expression was downregulated in cells exposed to haloperidol and risperidone confirming apoptosis induction by these drugs. Caspases 8 and 3 levels also increased in a dose-depend way. The inflammatory cytokine levels increased in all treatments (IL-1 β , IL-6, TNF α , INF γ) whereas IL-10 levels, a antiinflammatory cytokine decreased. **Conclusion:** The whole of results suggest that haloperidol and risperidone act directly on macrophages and can exacerbate inflammatory processes. The inflammatory mechanism of these actions can influence the development of obesity in patients that make long term use of these drugs.

Key- words: Antipsychotics, Inflammation, Macrophages, Apoptosis, Citokines

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
1.1 Epidemiologia das doenças neuropsiquiátricas.....	10
1.3 Caracterização farmacológica do Haloperidol.....	12
1.5 Efeitos adversos de antipsicóticos no metabolismo	16
1.6 Antipsicóticos e doenças metabólicas.....	17
1.6.1 O sistema imune e a biologia dos macrófagos.....	17
1.6.2 O tecido adiposo e a resposta imune	20
1.7 Linhagem de Macrófagos RAW 264.7.....	23
2 OBJETIVOS	25
3 RESULTADOS	26
5. CONCLUSÃO.....	50
REFERÊNCIAS.....	51

1. INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia das doenças neuropsiquiátricas

Os transtornos mentais representam um grande problema de saúde pública no Brasil e no mundo (OMS, 1993). Investigações epidemiológicas feitas na década de 90 já estimavam que cerca de 30% da população brasileira adulta apresentava algum tipo de transtorno mental no período de um ano. Entre as mulheres Transtornos de Ansiedade, somatoformes e depressivos são os mais prevalentes. Já na nos homens a dependência ao álcool e os Transtornos de Ansiedade são os mais prevalentes (MENEZES, 1996). Além disto, existem transtornos mentais de elevada gravidade ainda que sua prevalência populacional não seja alta. Este é o caso da esquizofrenia (MARI e LEITÃO, 2000).

Muitos transtornos, segundo a sua gravidade podem levar a ocorrência de estados psicóticos que são caracterizados pela “perda do contato com a realidade”. O termo psicose é oriundo do grego “psique”, para mente, e “ose”, para condição anormal, significando literalmente condição anormal da mente (KLINGER et al., 2013).

Nos períodos de crise os pacientes podem apresentar alucinações ou delírio, desorganizações psíquicas, pensamentos desorganizados ou paranoides, inquietude motora e falta de crítica relacionada à capacidade de reconhecer algum tipo de comportamento considerado fora dos padrões (APA, 2003). Além da esquizofrenia outros transtornos que podem apresentar quadros psicóticos incluem: transtornos bipolares, delirantes, depressão psicótica, transtornos de personalidade e esquizoafetivos (MARI e LEITÃO, 2000).

1.2 Terapêutica dos estados psicóticos

A história da psicofarmacologia moderna começou no final da década de 40 quando apareceram os primeiros fármacos capazes de tratar transtornos psiquiátricos. Assim, em 1949 foi feito o primeiro relato de que o lítio era capaz de tratar a mania. Na década de 50 surgiram os primeiros ansiolíticos como o meprobamato, o clordiazepóxido e posteriormente os

benzodiazepínicos. Neste período também surgiu a clorpromazina como fármaco com propriedades antipsicóticas. O impacto do surgimento dos fármacos antipsicóticos foi bastante grande. Estima-se que o número de pacientes psicóticos hospitalizados nos EUA diminuiu de 554.000 em 1954 para 77.000 em 1993, quase 40 anos depois (GORENSTEIN e SCAVONE, 1999).

Atualmente, existem diversos tipos de antipsicóticos, que podem ser classificados de acordo com o tempo em que foram fabricados. Os de primeira geração são os mais antigos e os de segunda geração, mais recentes. No entanto, não há diferença de eficácia comprovada entre os diferentes tipos, há diferenças sim nos efeitos colaterais. A escolha do antipsicóticos a ser tomado vai depender do perfil do paciente e da experiência de tratamento do médico (BRUNTON et al., 2007).

Os fármacos conhecidos como antipsicóticos são caracterizados por terem efeitos sedativos e psicomotores. Por este motivo, além de serem utilizados em episódios psicóticos ou em transtornos psiquiátricos também são utilizados como anestésicos e em outros distúrbios psíquicos e na fase de desintoxicação de substâncias psicoativas (MOREIRA E GUIMARRÃES, 2007).

Em termos farmacológicos, os antipsicóticos são divididos em típicos e atípicos. Os neurolépticos, uma subdivisão dentro dos antipsicóticos, foram os primeiros remédios desenvolvidos para o tratamento de sintomas positivos das psicoses. Estes fármacos são conhecidos como antipsicóticos típicos. Os fármacos atípicos foram desenvolvidos mais recentemente do que os típicos. Esta notação foi dada por apresentarem menores efeitos adversos psicomotores que ocorrem quando os pacientes são tratados com antipsicóticos típicos. Os antipsicóticos atípicos também diminuem os efeitos extrapiramidais como a acatisia e o parkinsonismo funcionando via atividade das rotas neurais nigroestriatal e mesocortical. Entre os antipsicóticos atípicos estão a clozapina, olanzapina, quetiapina, amissulprida, ziprasidona, aripiprazo e a risperidona (MOREIRA E GUIMARRÃES, 2007).

Os antipsicóticos atípicos também apresentam alguns efeitos adversos importantes que podem ter impacto na saúde dos pacientes. Os efeitos adversos potenciais destes antipsicóticos foram inicialmente descritos na década de 60 e evidências epidemiológicas posteriores confirmaram tal fato (ANANTH e KOLLI, 2005; DWYER et al., 2001; ANANTH et al., 2002; CASEY, 2005).

Esta afirmativa é baseada em estudos epidemiológicos que mostraram que pacientes esquizofrênicos quando comparados com a população em geral apresentam alta prevalência de doenças cardiovasculares e metabólicas (DAVIDSON, 2002; BRIDLER e UMBRICHT,

2003) incluindo obesidade, síndrome metabólica e diabetes do tipo II. O *American Heart Association* e o *National Heart, Lung and Blood Institute* bem como a Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia considera portadores de síndrome metabólica aqueles que possuem três ou mais dos seguintes critérios diagnósticos: obesidade (avaliada pela circunferência abdominal ≥ 102 cm para homens e ≥ 80 cm para mulheres), níveis elevados de triglicérides (≥ 150 mg/mL), glicose em jejum (≥ 110 mg/mL), pressão arterial sistêmica ($\geq 130/85$ mg/mL) e níveis baixos de HDL colesterol (≤ 40 mg/mL para homens e ≤ 50 para mulheres) (GRUNDI et al., 2004). O desenvolvimento da síndrome metabólica parece estar relacionado com o uso dos antipsicóticos atípicos de segunda geração (BRIDLER e UMBRICHT, 2003).

No Brasil, o haloperidol é o medicamento antipsicótico mais amplamente prescrito pelo Sistema Único de Saúde (SUS). Entretanto, existem casos em que o uso de antipsicóticos atípicos também é feito. Um estudo realizado por Lindner e colaboradores (2009) sobre o custo-benefício do uso de medicamentos antipsicóticos de primeira e segunda geração no tratamento da esquizofrenia sugerem que, na perspectiva do SUS os antipsicóticos haloperidol e risperidona apresentam melhor relação de custo-utilidade quando comparados a outros fármacos como a olanzapina.

1.3 Caracterização farmacológica do Haloperidol

O haloperidol é um antipsicótico típico que pertence à classe das butifenonas sendo indicado para diversas doenças além da esquizofrenia, como a mania, distúrbios comportamentais, síndrome de Tourette e crises de ansiedade grave (KUDO, 1999). Em muitas áreas do mundo o haloperidol é o único antipsicótico disponível. Por causa da sua ampla ação, e o seu uso há mais de 40 anos é considerado o neuroléptico mais prescrito em todo o mundo (BALDESSARINI, 1996; HARTLING et al., 2012). No Brasil este medicamento apresenta-se disponível com os nomes comerciais de Haldol® e Haloperidol® (MARGONATO et al., 2004).

Antipsicóticos tradicionais, como é o caso do haloperidol são eficazes em mais de 80% dos pacientes com esquizofrenia, atuando predominantemente nos sintomas chamados produtivos ou positivos (alucinações e delírios) e, em grau muito menor nos sintomas negativos (apatia, embotamento e desinteresse) (LIU-SEIFERT et al., 2011).

Em relação ao seu mecanismo de ação as vias mesolímbicas e mesocorticais do sistema nervoso central são aquelas onde ocorrem os efeitos terapêuticos do haloperidol. As vias mesolímbicas e mesocorticais confundem-se anatomicamente e ambas se originam no segmento ventral do mesencéfalo. A via mesolímbica inerva diversos núcleos subcorticais do Sistema Límbico: amígdala, núcleo acumbens, tubérculo olfatório e o septo lateral. A via mesocortical tem suas terminações sinápticas localizadas no córtex frontal, na parte anterior do giro do cíngulo e no córtex temporal medial (SCHATZBERG et al., 2007).

Nestas vias existem receptores da dopamina conhecidos como D1 e D2. No caso, o haloperidol age sobre SNC através de um bloqueio seletivo competitivo com os receptores dopaminérgicos D2 pós-sinápticos. Este bloqueio leva a um aumento do intercâmbio de dopaminas no nível cerebral para produzir a ação antipsicótica (MAILMAN e MURTHY, 2010).

O haloperidol pode ser ingerido como um pró-fármaco chamado éster decanoato ou simplesmente deconoato. Esta molécula tem uma ação prolongada por liberar de forma lenta e estável o haloperidol. No caso, o decanoato fica depositado no tecido adiposo o que prolonga a duração da ação do antipsicótico. Por este motivo, as concentrações do fármaco são detectáveis no plasma por várias semanas após uma única administração do mesmo. O deconoato é administrado sob a forma injetável a cada quatro semanas em pessoas com esquizofrenia ou doenças relacionadas (BRUNTON et al., 2007).

O haloperidol é completamente absorvido no trato gastrointestinal, sendo metabolizado no fígado, excretado na urina, no leite materno, nas fezes (MARGONATO et al., 2004).

A absorção do haloperidol por via oral é de 70% e a sua meia-vida plasmática varia entre 12 e 38 horas. Aproximadamente 92% das moléculas de haloperidol que são absorvidas e entram na corrente sanguínea se ligam a proteínas do plasma. Por este motivo o medicamento consegue ser amplamente distribuído nos tecidos corporais, também consegue cruzar a barreira hemato-encefálica (AHFS, 1999). A dose diária de haloperidol é de 10 a 15 mg (MUENCH et al., 2010). Aproximadamente 40% de uma única dose de haloperidol é excretada pela urina cinco dias após sua ingestão. Outros 15% da dose oral são excretados através das fezes (MARGONATO et al., 2004; MUENCH et al., 2010).

Apesar de o haloperidol bloquear os receptores D2 (de dopamina) ele também leva a certo bloqueio de outros receptores como os receptores alfa-adrenérgicos e serotoninérgicos. Esta condição está associada aos efeitos colaterais que são frequentes nos pacientes tratados com este antipsicótico. (GLARE et al., 2011)

O bloqueio dos receptores de dopamina provoca reações motoras extrapiramidais, diminui a liberação do hormônio de crescimento e aumenta a liberação de prolactina pela hipófise. Também existe certo bloqueio dos receptores alfa-adrenérgicos do sistema autônomo. No caso, todos os antipsicóticos, o que inclui o haloperidol estão associados ao aumento da sedação, disfunção sexual, hipotensão postural, arritmia cardíaca e morte súbita (MUENCH et al., 2010).

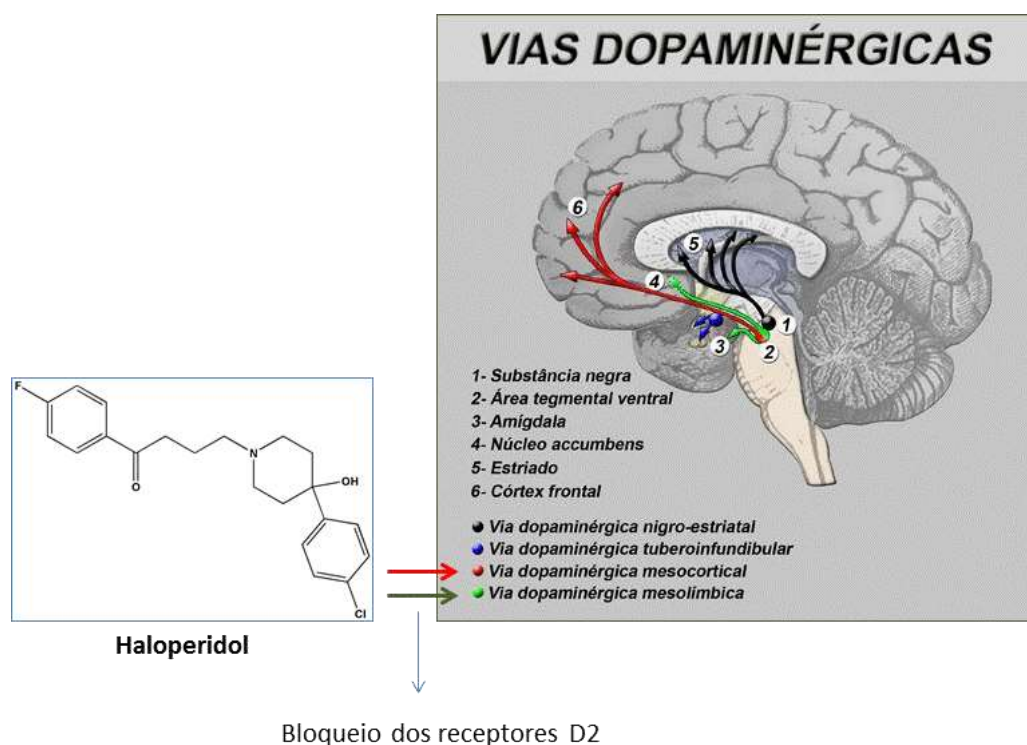


Figura 1 Estrutura química da molécula do haloperidol e seus principais sítios de ação no sistema nervoso central: bloqueio dos receptores dopaminérgicos D2 nas vias mesolímbicas e mesocorticais (MUENCH et al., 2010).

Um recente estudo realizado por Bodén e colaboradores (2013) incluiu 809 pacientes psiquiátricos mostrou que aqueles tratados com haloperidol apresentavam uma prevalência de 54% de síndrome metabólica. Esta prevalência foi bastante alta somente sendo mais baixa nos pacientes que recebiam tratamento com diversos tipos de fármacos psiquiátricos. Nestes a prevalência da síndrome metabólica foi de 57%. O principal componente da síndrome metabólica do qual o haloperidol parece agir é o aumento nos níveis de glicose.

1.4 Caracterização farmacológica da Risperidona

A risperidona é um antipsicótico atípico que vem utilizado na terapêutica psiquiátrica principalmente no tratamento da esquizofrenia, episódios maníacos severos associados ao distúrbio bipolar, crianças e adolescentes com desordens e comportamento agressivo. O fármaco também é utilizado em pacientes com demência de Alzheimer moderada a severa que apresentam agressividade, e ut no tratamento de transtornos de espectro autista (SCHATZBERG et al., 2007).

A risperidona é um antagonista seletivo monoaminérgico. Este fármaco também possui alta afinidade pelos receptores serotoninérgicos do tipo 2 (5-HT₂) e afinidade relativa pelos receptores dopaminérgicos do tipo 2 (D₂). No SNC a risperidona funciona como um potente bloqueador da dopamina através da inibição do funcionamento dos seus receptores. Provavelmente o efeito antipsicótico da risperidona está relacionado a este antagonismo seletivo. A risperidona também pode bloquear receptores alfa 2-adrenérgicos e histaminérgicos H₁. Sua absorção oral é de 70% (biodisponibilidade) e através da biotransformação hepática da risperidona é que se origina o metabólito ativo deste fármaco (9-hidroxisperidona). Sua meia vida no plasma é de 3 a 20 horas, sendo excretada pelos rins através da urina (HEIKANTS et al., 1994; RAMOS et al., 2006).

Assim como outros antipsicóticos a risperidona apresenta efeitos colaterais importantes como sintomas extrapiramidais, tonturas, náuseas, distúrbios no sono (insônia/sonolência), constipação, hipotensão, dor abdominal, renite, agressão, diminuição no desejo sexual, taquicardia entre outras. A resposta a risperidona parece ser geneticamente influenciada (LLERENA et al., 2013) também ocorrendo maior risco de desenvolvimento de síndrome metabólica em pacientes tratados com este fármaco (RIEDEL et al., 2005). No estudo conduzido por Bodén e colaboradores (2013) previamente citado a prevalência de pacientes tratados com risperidona que apresentaram síndrome metabólica foi de 42%. Esta prevalência foi maior do que a observada em outros antipsicóticos como o aripiprazol (35%), flupentixol (39%) e ziprasidona (43%). Entretanto, foi levemente mais baixa que a olanzapina (45%) que também é utilizada pelo SUS em pacientes que não se adaptam ao haloperidol (LINDNER et al., 2009).

1.5 Efeitos adversos de antipsicóticos no metabolismo

O uso crônico de antipsicóticos tem sido sistematicamente relacionado com o desenvolvimento de doenças metabólicas, particularmente a obesidade. Este fato muitas vezes contribui a falta de adesão ao tratamento psiquiátrico (KAPUR e REMINGTON, 2001). Os mecanismos causais desta associação ainda não estão totalmente esclarecidos e são de grande interesse científico e clínico.

Hoje é sabido que distúrbios no tecido adiposo causados principalmente pela obesidade podem levar as alterações que caracterizam a síndrome metabólica. Isto ocorre porque o aumento das adipocinas associadas ao aumento no estresse oxidativo dos adipócitos e a disfunção endotelial dos vasos sanguíneos fazem parte dos indivíduos obesos com síndrome metabólica (NIKOLOPOULOU e KADOGLOU, 2012). Por este motivo o efeito de antipsicóticos na adipogênese (produção de novos adipócitos) e lipogênese (acúmulo de gorduras no adipócito maduro) é relevante.

Um estudo prévio realizado por Sertié e colaboradores (2011) investigou o efeito de antipsicóticos (clozapina, olanzapina, ziprasidona e haloperidol) na proliferação e diferenciação de adipócitos humanos e também na lipogênese de adipócitos humanos maduros. Os resultados mostraram que o haloperidol exerceu um estímulo leve na adipogênese. Entretanto, nos adipócitos maduros apresentou efeito inibitório forte tanto na lipogênese basal e quando estimulada por insulina. A partir destes resultados os autores sugeriram que o haloperidol poderia induzir efeitos colaterais sérios relacionados com a diminuição na capacidade lipogênica do tecido adiposo humano. Este efeito não foi observado nos antipsicóticos de segunda geração como a clozapina e a olanzapina. Já a risperidona não foi investigada no referido estudo.

Em relação à risperidona foi realizado um estudo *in vitro* em adipócitos conduzido por Vestri e colaboradores (2007), investigando se os antipsicóticos atípicos como a risperidona, clozapina, olanzapina e a quetiapina teriam ação sobre a taxa de transporte da glicose estimulada pela insulina em cultura de adipócitos (linhagem 3T3-L1). No caso, os antipsicóticos atípicos incluindo a risperidona afetaram a ação da insulina e o metabolismo dos adipócitos levando a distúrbios na lipólise e também alterando a lipogênese. Os autores postularam que estas influências estariam relacionadas com o efeito adverso dos antipsicóticos que leva aos distúrbios cardiometabólicos.

1.6 Antipsicóticos e doenças metabólicas

1.6.1 O sistema imune e a biologia dos macrófagos

O sistema imune tem a função de proteger o corpo contra microorganismos e outros agentes ou situações que possam causar alterações morfofuncionais indesejáveis. Geralmente a função imunológica é dividida em duas: imunidade inata e imunidade adaptativa ou adquirida. O sistema imune inato é responsável por respostas imunológicas imediatas e estereotipadas através de barreiras físicas, químicas e biológicas que são produzidas por células e moléculas especializadas. Estas respostas não dependem do sistema já ter entrado em contato prévio com um determinado agente patológico. O sistema imune adquirido é mais complexo, pois envolve células (linfócitos) que irão desenvolver respostas imunológicas específicas a um determinado patógeno. Apesar desta divisão, ambas as vias trabalham de modo interativo a fim de manter o organismo saudável (CRUVINEL et al., 2010).

As principais células efetoras da imunidade inata são os macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e células *Natural Killer* – NK. Neste sistema, que regula diretamente processos inflamatórios, os monócitos/macrófagos têm um papel destacado. Estas células pertencem ao sistema fagocítico mononuclear e constituem 3% a 8% dos leucócitos do sangue periférico. Os monócitos presentes no sangue se originam dos pró-monócitos localizados na medula óssea. Quando ocorre algum tipo de invasão microbiana ou lesão tecidual os monócitos deixam o sangue e se infiltram nos tecidos sofrendo alterações citofisiológicas passando a serem chamados de macrófagos (CRUVINEL et al., 2010).

Monócitos/macrófagos são componentes essenciais do sistema imune inato possuindo uma grande variedade de funções. Controlam o início e a resolução da inflamação através da fagocitose, liberação de citocinas inflamatórias, espécies reativas de oxigênio (EROs) e ativação do sistema imune adquirido (AUFRAY et al., 2007). Sob circunstâncias normais, monócitos circulam na corrente sanguínea por curto período de tempo antes de entrarem espontaneamente em apoptose (FAHY et al., 1999). Em resposta a fatores de diferenciação os monócitos escapam da apoptose e se diferenciam em macrófagos, que são células que podem viver por longo período de tempo em um determinado tecido corporal (WIKTOR-JEDRZEJCZAK et al., 1996). Assim, a presença de fatores estimulatórios (como antígenos)

inibe a apoptose dos monócitos que se diferenciam em macrófagos. Quando o processo inflamatório se resolve, os programas apoptóticos são reassumidos e as células excedentes voltam a entrar em apoptose (SAVILL e FADOK, 2000).

Os próprios macrófagos produzem muitas substâncias solúveis relevantes a resposta imunológica e para o processo inflamatório. Entre estas estão as citocinas inflamatórias como a interleucina 1 beta (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6), Fator de necrose tumoral alfa (TNF α), e a citocina anti-inflamatória interleucina 10 (IL-10). Além disto, produzem fatores que são críticos no combate a microrganismos, como os metabólitos do oxigênio e óxido nítrico; fatores que promovem o reparo tecidual, como o fator de crescimento de fibroblasto entre outros. (CRUVINEL et al., 2010).

A ativação dos monócitos/macrófagos é desencadeada pelo reconhecimento de estímulos próprios e externos que podem ser mediados por uma enorme diversidade de receptores intracelulares de membrana. A atuação imunológica dos macrófagos envolve a sua ativação. Existe a “ativação clássica” e a “ativação alternativa” dos macrófagos. Na ativação clássica, um determinado agente imunológico (antígeno) é inicialmente reconhecido por proteínas presentes na membrana dos macrófagos (Lipopolissacarídeo-LPS-) ou através de sinais endógenos como a presença de proteínas de choque térmico. Estudos também têm mostrado que a ativação de macrófagos depende do estímulo de citocinas inflamatórias produzidas por linfócitos auxiliares ou células NK, em especial o interferon gama (INF γ) (GORDON, 2003).

Macrófagos ativados pela via clássica participam como indutores da inflamação e são denominados “M1”. Estes macrófagos produzem níveis elevados de interleucina 2 (IL-2) e baixos níveis de IL-10. Os macrófagos ativados que possuem atividade microbicida e tumoricida são caracterizados por secretarem grandes quantidades de citocinas e mediadores pró-inflamatórios. Nesta resposta inflamatória estes macrófagos liberam citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6, Fator de necrose tumoral alfa (TNF α) e também produzem espécies reativas de oxigênio (EROS) como o ânion superóxido (O $_2^{\bullet-}$), e o peróxido de hidrogênio (H $_2$ O $_2$), bem como intermediários reativos como é o caso do óxido nítrico (ON) (GORDON, 2003).

Já a ‘ativação alternativa’ envolve o estímulo de macrófagos por moléculas como as interleucinas IL-4 e IL-13 que levam ao aumento nos níveis de citocina anti-inflamatória IL-10 e ao reparo tecidual. A ativação alternativa é, portanto considerada como uma resposta anti-inflamatória. No organismo a resposta imunológica inflamatória geralmente é seguida pela resposta imunológica anti-inflamatória. Ela é importante para que haja reparo tecidual

após uma infecção microbiana ou uma injúria física. O desbalanço entre as duas respostas pode gerar doenças crônicas com baixo grau de inflamação como é o caso da obesidade e outros distúrbios metabólicos (MAURO et al., 2015) e psiquiátricas como é o caso da esquizofrenia (MÜLLER, 2015), ou mesmo, levar a septicemia e falência de órgãos caso a doença seja do tipo infecciosa.

Uma vez ativados, os macrófagos M1 desenvolvem a capacidade de fagocitar microorganismos ou componentes do tecido lesado e de realizar digestão intracelular do material fagocitado. Esta é a principal função efetora destas células. Estudos mostraram que logo após o processo de fagocitose os macrófagos morrem por morte celular programada conhecida como apoptose (HACKER et al., 2002).

Diferente da necrose, a apoptose é um tipo de morte celular programada que ocorre de modo organizado e desencadeado pela própria célula. Para tanto, a célula fragmenta o seu material genético (DNA) e produz lisossomos que digerem todo o conteúdo citoplasmático incluindo as organelas. Estes lisossomos passam a se chamar corpos apoptóticos. Uma vez que todo o conteúdo celular esteja devidamente armazenado nos corpos apoptóticos a membrana celular se rompe e tais corpos apoptóticos são então engolfados por células vizinhas sem que haja nenhum distúrbio fisiológico. Geralmente os restos apoptóticos são fagocitados por macrófagos presentes no tecido conjuntivo de um determinado órgão (ELMORE et al 2007).

A apoptose ocorre via uma série de eventos moleculares que podem iniciar de modo distinto. Existem duas vias para o desencadeamento deste processo: a via extrínseca e a via intrínseca (ou mitocondrial) (BEUREL et al., 2006).

A via extrínseca ocorre através da ligação de moléculas pró-apoptóticas em receptores presentes na membrana celular (receptores de morte). Entre estes receptores estão as proteínas do fator de necrose tumoral (TNF1) e a proteína Fas. A ligação destas proteínas com a membrana celular ativa moléculas de caspase 8 que estavam inativas no citoplasma das células. Esta ativação estimula outras caspases, como a caspase 3 a desencadear a apoptose celular. A via intrínseca ocorre quando existem danos no DNA que são inicialmente detectados pela proteína p53 no momento em que a célula é estimulada a se dividir (ELMORE et al., 2007).

Existem mais de 20 tipos de proteínas da família Bcl-2 que estão envolvidas com esta rota apoptótica. Em uma célula que irá se dividir existem muitas proteínas que estão em concentração mais elevada. Este é o caso da proteína Bcl-2. Entretanto, em uma célula que é induzida a apoptose, os níveis da expressão e concentração da proteína Bcl-2 baixam

enquanto que os níveis da proteína Bax se elevam. Esta condição faz com que a membrana da mitocôndria se torne mais permeável e libere para o citoplasma moléculas de citocromo c. Esta molécula se liga a caspase 9 e a caspase 8. Tal ligação também irá ativar a rota das caspases, em especial a caspase 3 que desencadeará os eventos da apoptose (ELMORE et al., 2007).

Em situações de inflamação crônica não causada por agentes patogênicos, uma destruição tecidual continuada ocorre levando o organismo a manter o circuito de produção de citocinas pró-inflamatórias, apoptose de macrófagos e outras células do sistema imune, e novo recrutamento de macrófagos que voltam a ativar tal circuito.

1.6.2 O tecido adiposo e a resposta imune

Uma vez que os monócitos sejam produzidos na medula óssea e liberados na corrente sanguínea muitos deles migram para diversos tecidos corporais, onde pela ação microambiental sofrem uma grande variedade de transformações se ajustando funcionalmente as necessidades do local onde estão. Stout e Suttles (2004) na sua revisão sobre o tema consideram que “macrófagos possuem uma grande plasticidade funcional”.

Antigamente o tecido adiposo era considerado somente um compartimento celular onde ocorria o armazenamento e fornecimento de ácidos graxos conforme as necessidades energéticas do organismo. No entanto, em 1994 a identificação da molécula leptina mudou este paradigma. A partir de então o tecido adiposo passou a ser também considerado como um órgão endócrino (ZHANG et al., 1995). Outros estudos demonstraram também que o tecido adiposo possui um papel central na resposta imune inata, pois secreta uma variedade de peptídeos e hormônios relacionados a defesa corporal. Isto ocorre via presença dos macrófagos presentes no tecido adiposo que produzem algumas moléculas (citocinas) pró-inflamatórias e anti-inflamatórias (HUTLEY e PRINS, 2005; DESRUISSEAU et al., 2007).

Existem aproximadamente 50 moléculas biologicamente ativas que o tecido adiposo produz e secreta, denominadas adipocinas. Estas biomoléculas possuem funções variadas conforme o tipo de tecido e órgão como a leptina (ZHANG et al., 2005), a adiponectina e outras moléculas incluindo o fator α de necrose tumoral (TNF- α), o PAI-1 (MUTCH et al., 2001), a resistina (STEPPAN e LAZAR, 2004) a visfatina (FUKUHARA et al., 2005) e as citocinas IL-6 (MOHAMED-ALI et al., 1998) e IL-1 β (TRAYHURN e WOOD, 2005).

As adipocinas têm sido classificadas dentro de uma variedade de grupos de proteínas que estão relacionadas a diversas rotas metabólicas incluindo a modulação da hemóstase/coagulação, pressão sanguínea, metabolismo lipídico, apetite, balanço energético, angiogênese, sensibilidade à insulina, imunidade e resposta inflamatória a fase aguda (WOOD et al., 2011). Além disso, citocinas com a interleucina 6 (IL-6) são agora reconhecidas como moléculas pró-inflamatórias importantes pois ativam outras moléculas pró-inflamatórias e diminuem, por outro lado, moléculas anti-inflamatórias (Figura 2).

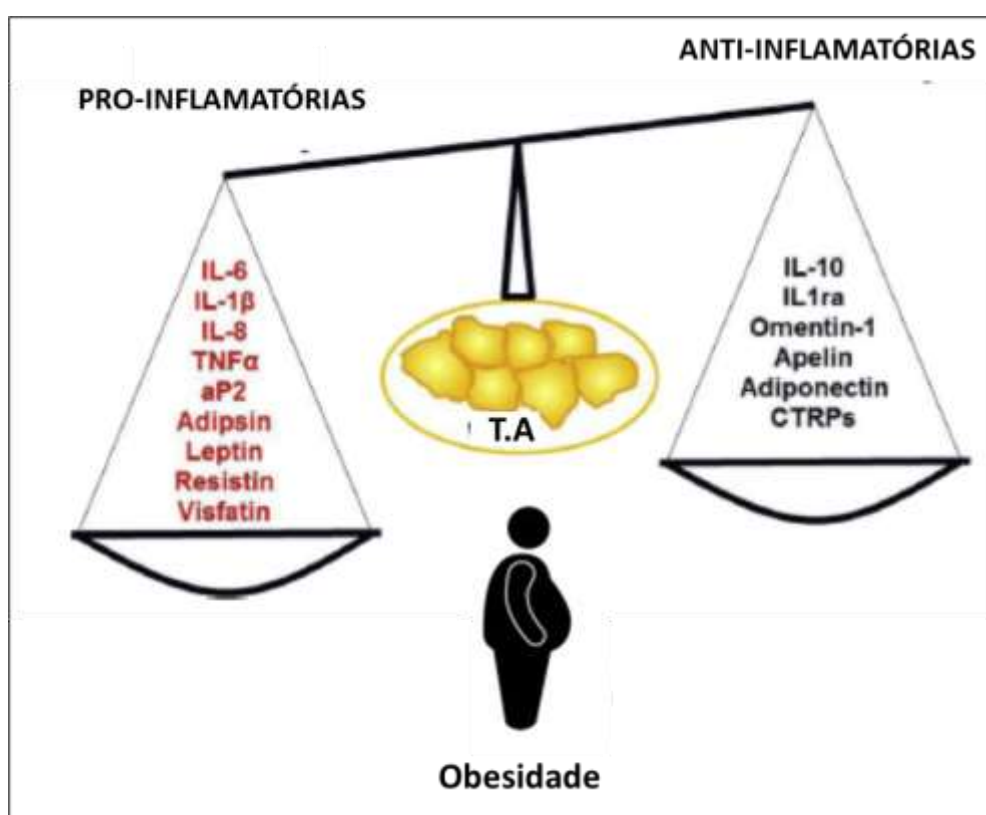


Figura 2 Esquema do desbalanço entre moléculas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias na obesidade. TA= tecido adiposo. (Fonte: AGUILAR-VALLES et al., 2015).

Acredita-se que este desbalanço continuado entre moléculas pró e anti-inflamatórias predispõe o desenvolvimento da obesidade e outros distúrbios metabólicos.

A citocina TNF α foi uma das primeiras citocinas identificadas por ser secretada pelo tecido adiposo branco. Junto com outras citocinas inflamatórias incluindo a IL-1 β e IL-6

também tem um papel importante na inflamação crônica e resistência a insulina (AGUILAR-VALLES et al., 2015).

1.6.3 Psicose, antipsicóticos e sistema imune

Muitas investigações têm relatado elevação nos níveis de citocinas inflamatórias tanto no soro, plasma como no líquido cerebrospinal de pacientes psiquiátricos, em especial esquizofrênicos ou com psicose aguda (MÜLLER, 2015). Por esta razão, Bergink e colaboradores (2014) postularam que na esquizofrenia e nos eventos de psicose aguda ocorre concomitante aumento nos níveis de citocinas pró-inflamatórias tanto na micróglia quanto nos monócitos do sangue periférico. Na meta-análise feita por Miller e colaboradores (2011) os autores relataram a ocorrência de associação entre níveis altos de interleucina 1 beta (IL-1 β), IL-6 e fase aguda da psicose.

De fato, citocinas e seus receptores tem uma importante função na comunicação entre o sistema imune e o sistema nervoso central e periférico porque são capazes de atravessar a barreira hemato-encefálica. Por este motivo, níveis circulantes no sangue de citocinas têm sido considerados marcadores potenciais de esquizofrenia e psicose em fase aguda em estudos clínicos e em protocolos experimentais (SONG et al., 2014; NOTO et al., 2014; MÜLLER, 2015).

Alguns estudos clínicos relataram efeito da risperidona sobre a modulação das citocinas (NOTO et al., 2014; DE WITTE et al., 2014). Entretanto, os resultados são ainda bastante controversos. Por exemplo, um estudo conduzido por Al-Amin e colaboradores (2013) que obteve células mononucleares do sangue periférico (CMSPs) de 12 pacientes que apresentaram o seu primeiro episódio de esquizofrenia tratadas *in vitro* com quatro diferentes tipos de fármacos antipsicóticos (haloperidol, clozapina, quetiapina e risperidona) mostrou aumento nos níveis de interferon gamma (INF- γ), uma citocina pró-inflamatória. Entretanto, este mesmo estudo também relatou aumento nos níveis da citocina anti-inflamatória Interleucina 10 (IL-10).

Por outro lado, uma investigação conduzida por Song e colaboradores (2014) sugeriu que o tratamento com risperidona produziria inicialmente um efeito anti-inflamatório que seria potencialmente reduzido ao longo do seu uso. Os autores sugeriram que a redução no efeito anti-inflamatório poderia ser uma consequência secundária do ganho de peso, já que a

obesidade aumenta os níveis de citocinas pró-inflamatórias. Esta hipótese não chegou a ser confirmada por outras investigações como a realizada por Sarvari e colaboradores (2014) que trataram células tronco mesenquimais originadas no tecido adiposo com seis diferentes antipsicóticos incluindo haloperidol e risperidona. Os resultados mostraram que tais fármacos aumentaram a expressão de genes relacionados a adipogênese, metabolismo lipídico e de citocinas pró-inflamatórias incluindo TNF α e IL-1 β .

O aumento na expressão de genes pró-inflamatórios também indica potencial desencadeamento da rota da apoptose dos macrófagos ativados. Kirschnek e colaboradores (2005) estudando os mecanismos relacionados a apoptose induzida pela fagocitose descreveram que moléculas indutoras da inflamação como LPS podem também induzir apoptose de forma similar a fagocitose de uma bactéria, embora tal indução seja menos intensa. Outros estudos como o desenvolvido por Karabay e colaboradores (2014) demonstraram que determinadas moléculas tem a capacidade de induzir apoptose em macrófagos como o composto organofosforado natural metilsulfonilmetano (MSM). Esta molécula é usada como suplemento dietético por ser benéfica no tratamento de várias doenças que levam a inflamação crônica, em especial a artrite. Neste estudo, os macrófagos foram ativados por LPS o que determinou aumento de citocinas inflamatórias e também desencadeamento da apoptose. Nos macrófagos ativados que foram tratados com diferentes doses de MSM ocorreu reversão da apoptose indicando sua atividade anti-inflamatória.

No caso, o haloperidol e a risperidona poderiam estar atuando justamente ao contrário: estimulando a ativação de macrófagos que, por sua vez produziriam citocinas inflamatórias e entrariam em apoptose, sem que ocorresse a devida estimulação anti-inflamatória. Esta condição estimularia o recrutamento de novos macrófagos que perpetuariam assim o circuito inflamatório. Deste modo, resta saber se o haloperidol e a risperidona teriam efeito inflamatório diretamente nos macrófagos e na ativação dos mesmos via produção de citocinas inflamatórias e apoptose.

1.7 Linhagem de Macrófagos RAW 264.7

Para a investigação *in vitro* de efeitos farmagenômicos que envolvem ativação de macrófagos o uso de linhagens celulares comerciais de células mononucleares é bastante

apropriado, já que pode ser reproduzido por outros grupos de pesquisa e também porque evita a potencial interferência de moléculas produzidas por outras células do sistema imune. Uma linhagem que tem sido amplamente utilizada em estudos que envolvem análise de atividade pró-inflamatória ou anti-inflamatórias de fármacos, extratos de plantas ou outros agentes químicos é a linhagem de macrófagos RAW 264.7. Tal linhagem é constituída por células que possuem propriedades de macrófagos normais artificialmente obtida a partir da infecção com o vírus Albelson de ratos Balb-C por Raschke e colaboradores (1978). A linhagem RAW 264.7 é comercializada pela ATCC (American Type Culture Collection), uma organização não governamental sem fins lucrativos (ATCC® TIB-71™).

Os macrófagos RAW são ativados por LPS, e tal ativação leva a produção de mediadores pró-inflamatórios incluindo NO , prostaglandinas E_2 e também citocinas como a $IL-1\beta$, $IL-6$ e $TNF\alpha$, a seguir, tais células são induzidas a apoptose. Quando se quer observar a atividade anti-inflamatória de um determinado composto, os macrófagos RAW são ativados com LPS e se observa a ocorrência de reversão na produção de citocinas e na apoptose (KARABAY et al., 2014). Por outro lado, a ativação destas células por determinados fármacos podem indicar atividade pró-inflamatória dos mesmos. Por este motivo, geralmente esta linhagem celular é utilizada para avaliar efeitos anti-inflamatórios de fármacos e extratos de plantas (DEL-ÁNGEL et al., 2015; ZHANG et al., 2015; JUNG et al., 2014).

Nestes termos, uma estratégia metodológica aceitável diz respeito à avaliação de potencial efeito inflamatório utilizando a linhagem de macrófagos RAW 264.7 através da substituição da ativação por LPS pela potencial ativação de fármacos como o haloperidol e a risperidona avaliando efeito na viabilidade, proliferação celular e modulação dos níveis de citocinas da cascata inflamatória.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Analisar o efeito farmacogenômico *in vitro* da exposição ao haloperidol e risperidona em marcadores da cascata inflamatória da linhagem comercial de macrófagos RAW 264.7

2.2 Específicos

Avaliar o efeito farmacogenômico *in vitro* da exposição ao haloperidol e risperidona em marcadores da cascata inflamatória da linhagem comercial de macrófagos RAW 264.7 através da avaliação:

- da viabilidade celular em 24, 48 e 72 horas de exposição;
- da modulação do ciclo celular em células expostas durante 72 h aos fármacos antipsicóticos;
- dos níveis de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, TNF α , INF γ) e da citocina anti inflamatória IL-10;
- dos níveis de produção de óxido nítrico nas células expostas durante 24 h aos fármacos antipsicóticos;
- da indução de apoptose via análise de células marcadas com anexina V, níveis de caspases 3 e 8 e da modulação dos genes Bax e Bcl-2;

3 RESULTADOS

Os itens “Materiais e métodos” e “Resultados” referentes a esta dissertação, estão apresentados sob a forma de um manuscrito a seguir. A apresentação do manuscrito está baseada na versão a ser submetida à revista *Journal of Neuropharmacology* com o título de “Haloperidol and Risperidone activate an in vitro inflammatory response of RAW 264.7 macrophage cells by increase of apoptosis and cytokine levels”

Haloperidol and Risperidone activate an in vitro inflammatory response of RAW 264.7 macrophage cells by induction of apoptosis and cytokine levels

Ivo Emílio da Cruz Jung, Alencar Kolinski Machado, Ivana Beatrice Mânica da Cruz, Fernanda Barbisan, Verônica Azzolin, Thiago Duarte, Marta Maria Medeiros Frescura Duarte, Pedro Antonio Schmith do Prado-Lima, Guilherme Vargas Bochi, Rafael Noal

Moresco

Abstract

Antipsychotic drugs, such as haloperidol and risperidone are used in long-term treatment and increase the risk of obesity and other metabolic dysfunctions in psychiatric patients. There are some evidences suggesting that these drugs have proinflammatory effect, which contributes to the establishment of endocrine disturbs. However, results produced until now are contradictory. Therefore, we tested here the *in vitro* effect of different concentrations of haloperidol and risperidone on activation of isolated macrophages (RAW 264.7 cell line). The results showed that both drugs were able to activate macrophages. The activation involved increase in nitric oxide levels and apoptosis events by modulation of caspases 8 and 3 levels and decrease of the Bcl-2/BAX gene expression ratio. Cells treated with haloperidol and risperidone also presented higher concentrations of inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF α) and low levels of IL-6 anti-inflammatory cytokine in a dose-dependent way. Probably, antipsychotic drugs exacerbate and cause chronicity of the inflammatory process on peripheral tissues (blood and fat) by macrophage activation. The continued activation of macrophages could contribute to the development of obesity and other endocrine disturbs caused by the use of antipsychotic drugs.

Key-words

Antipsychotic drugs; apoptosis; inflammation; cytokines, obesity, endocrine disturbs

1. Introduction

Pharmacological treatment of schizophrenia includes the long-term use of antipsychotic drugs. Haloperidol and risperidone are among the first and second generation of antipsychotic drugs broadly used in psychiatric clinic. However, the treatment with these drugs has been associated with an increase of obesity and other metabolic dysfunctions, such as dyslipidemia and insulin resistance (Monteleone et al., 2009; Medved et al., 2009; Muench and Hamer, 2010).

Since obesity is considered a low-grade inflammatory disease, a hypothesis to explain the increase in its prevalence in patients treated with antipsychotic drugs is the triggering of alterations on inflammatory metabolism. In fact, some clinical studies reported risperidone effect on cytokines modulation (Noto et al., 2014; de Witte et al., 2014). However, until now results about the effect of antipsychotic drugs on inflammatory metabolism are recent, and results are incipient and contradictory. For example, Al-Amin et al (2013) performed an *in vitro* investigation using peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) obtained from twelve patients with first-episode schizophrenia. The authors stimulated the cells with haloperidol, clozapine, quetiapine and risperidone. The results showed that all antipsychotic drugs reduced Interferon- γ (IFN- γ) levels and increased IL-10 levels indicating anti-inflammatory effect of these drugs. However, other investigation performed by Song et al (2014) suggested that risperidone treatment produces an initial anti-inflammatory effect that is reduced during treatment. The authors postulated that alteration on inflammatory metabolism associated with antipsychotic use could be actually due to the weight gain side effect.

To clarify the antipsychotic drug effects on adipocyte tissue, a recent *in vitro* study was made and the results suggested an inverse effect on primary human adipose-derived stem cells exposed to six antipsychotic drugs including risperidone and haloperidol. These drugs

changed the expression levels of critical regulatory genes of adipogenesis, lipid metabolism and inflammation during the differentiation of adipose-derived stem cells. Antipsychotics drugs induced the proinflammatory cytokines such as TNF- α and IL-1 β genes. These drugs also induced adipocyte differentiation genes and the adipocyte hormones leptin and adiponectin (Sarvari et al., 2014). Considering Sarvari's results, it seems that antipsychotic drugs have a direct effect on the inflammatory system.

Since immune cells present high plasticity in response to micro environmental conditions (x), the investigation of haloperidol and risperidone effect on isolated macrophages can be relevant. Therefore, considering these apparent conflicting results related to the action of antipsychotic drugs on inflammatory response peripheral cells, we tested here the *in vitro* effect of haloperidol and risperidone on the activation of macrophage cell line (RAW 264.7). Haloperidol and risperidone effect on cell viability, nitric oxide production, modulation of apoptosis pathway, and cytokines associated with inflammatory metabolism (IL-1 β , IL-6, TNF α , INF γ and IL-10) were analyzed.

2. Material and Methods

Cell culture and treatments

Murine RAW 264.7 macrophages (ATCC TIB-71) were cultured in RPMI 1640 supplemented with 10% FBS, penicillin (100 U/ml) and streptomycin (100 mg/ml). Cells were seeded in 96-well plates, and allowed to adhere at 37°C in 5% CO₂ 95% air for 24 h. Further, cells were exposed to haloperidol and risperidone at different concentrations for 24, 48 and 72 h to evaluate the potential effect of these drugs on macrophage activation.

2.1 Viability assay

The drug effect on cells viability and proliferation was determined by MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] spectrophotometric assay as described by Santos Montagner et al (2010). The cells were incubated for 4 h with MTT reagent. After formazan salt was dissolved with dimethylsulfoxide (DMSO), absorbance was measured at 570 nm in a 96-well SpectraMax M2/M2e Multi-mode Plate Reader, (Molecular Devices Corporation reader). All assays were performed in triplicate and results presented as percent of untreated control group.

2.2 Nitric oxide (NO) quantification

The NO quantification was measured by the modified Griess method using the Cobas Mira automated analyzer previously described by Tatsch et al (2011) that quantify nitrite/nitrate production. Briefly, 50 μ L of culture medium was pipetted into the reaction cuvette and 50 μ L of VCl₃ was added to reduce nitrate to nitrite after 25 s. Thus, 50 μ L of Griess reagent was added. The mixture sample/VCl₃/Griess reagent was incubated for 20 min and read at 550 nm. All incubations were at 37 °C and results were expressed in μ mol/L.

2.2 Flow cytometric analysis of apoptotic and necrotic cells

The haloperidol and risperidone effect on RAW macrophages apoptosis and necrosis was evaluated by flow cytometry using the FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I as manufactures instruction. Apoptosis is detected from annexin V that is used to determine and to quantify cells undergoing apoptosis, because in apoptotic cells, the membrane phospholipidphosphatidylserine (PS) is translocated from the inner leaflet of the plasma membrane to the outer leaflet, thereby exposing PS to the external environment. Propidium Iodide (PI) was used to distinguish viable from nonviable cells. Viable cells with intact membranes exclude PI, whereas the membranes of dead and damaged cells are permeable to

PI. The quadrants mean of data: lower right – apoptosis, annexin V binding; upper right – necrosis after apoptosis, both of PI and annexin V binding; upper left – necrosis, PI staining; lower left – live cells.

2.3 Cell cycle analysis by flow cytometry

The cell cycle analysis was also performed using flow cytometry after 72 h of macrophages treated with haloperidol and risperidone at 20, 30 and 40 $\mu\text{g/mL}$. Cells were seeded in 6-well plates at 5×10^4 cells per well in 2 mL of the different treatment in DMEM and incubated for 24 and 72 hours. Following incubation the cells were trypsinized, washed with PBS and resuspended in 70% ethanol (the suspension was put in the vortex) at -20°C overnight. Prior to analysis, the cells were centrifuged and washed once with PBS, after that the cells were resuspended in 500 μl PI-solution in PBS: 50 $\mu\text{g/ml}$ PI from 50x stock solution (2.5 mg/mL 0.1 mg/ml RNase A 0.05% Tritin X-100 and incubated for 40 min at 37°C . Finally was added 3 ml of PBS for washing and resuspended in 500 μl PBS for flow analysis (William-Faltaos, Rouillard, Lechat, & Bastian, 2006).

2.4 Caspase and cytokine immunoassays

The analysis of caspases levels can indicate the apoptosis pathway activation whereas analysis of some cytokines levels can indicate inflammatory route activation evaluated. CASP- 8, -3, and -1 and cytokines IL-1 β , IL-6, TNF α , Igy, IL-10 were performed in the cells exposed to haloperidol and risperidone using the Quantikine Human Caspase Immunoassay to measure CASP in the cell culture supernatants, according to the manufacturer's instructions. Briefly, all reagents and working standards were prepared and the excess microplate strips were removed. The assay diluent RD1W was added (50 μL) to each well. Further, 100 μL of standard control for our sample was added per well, after which the well was covered with the

adhesive strip and incubated for 1.5 h at room temperature. Each well was aspirated and washed twice for a total of three washes. The antiserum of each molecule analyzed here was added to each well and covered with a new adhesive strip and incubated for 30 min at room temperature. The aspiration/wash step was repeated, and the caspase-1 conjugate (100 μ L) was added to each well and incubated for 30 min at room temperature. The aspiration/wash step was repeated and 100 μ L of substrate solution was added to each well and incubated for 20 min at room temperature. Finally, the 50 μ L stop solution was added to each well and the optical density was determined within 30 min using a microplate reader set to 450 nm.

2.5 mRNA expression analysis by quantitative QT-PCR assay

The haloperidol and risperidone effect on some Bcl-2 and BAX genes that are related to intrinsic route of apoptosis triggering was measured by QT-PCR as described previously in Barbisan et al (2014). Total RNA was isolated using TRIzol reagent. RNA yields were measured using a Nanodrop 2000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, Del., USA). First strand cDNA was synthesized from total RNA (2 μ g) using a First Strand cDNA Synthesis Kit and oligo dT primers (Iscript, Biorad, USA). Q-PCR was performed in a 10 μ l reaction that contained 0.5 μ l of the cDNA and 1 \times KAPA SYBR[®] FAST Universal qPCR Master Mix (Kapa Biosystems, Woburn, MA, USA) using the following PCR parameters: 95 $^{\circ}$ C for 3 min followed by 40 cycles of 95 $^{\circ}$ C for 10 s, 60 $^{\circ}$ C for 30 s followed by a melt curve of 65 $^{\circ}$ C to 95 $^{\circ}$ C in 0.5 $^{\circ}$ C increments for 5 s. The expression level of beta-actin was used as an internal control. The relative expression was calculated using the comparative Ct and was expressed as the fold expression compared to the control. The specific primer pairs used here were: BAX “FCCCTTTTCTACTTTGCCAGCAA” and “R CCCGGAGGAAGTCCAATGT” and Bcl-2 “F GAGGATTGTGGCCTTCTTTGAGT” and “R AGTCATCCACAGGGCGATGT”

2.6 Statistical Analysis

The results among treatments were compared by one way ANOVA analysis of variance followed by *post hoc* Dunnet test using Graphpad Prism 5 software. The results were expressed as mean \pm standard deviation. The $p \leq 0.05$ were considered significant.

3. Results

The NO levels that indicate macrophage activation were compared among control and cells treated with haloperidol and risperidone at different concentrations (Figure 1). NO levels were significantly higher in cells treated with haloperidol at 30 and 40 μ M concentrations and with all risperidone concentrations tested here.

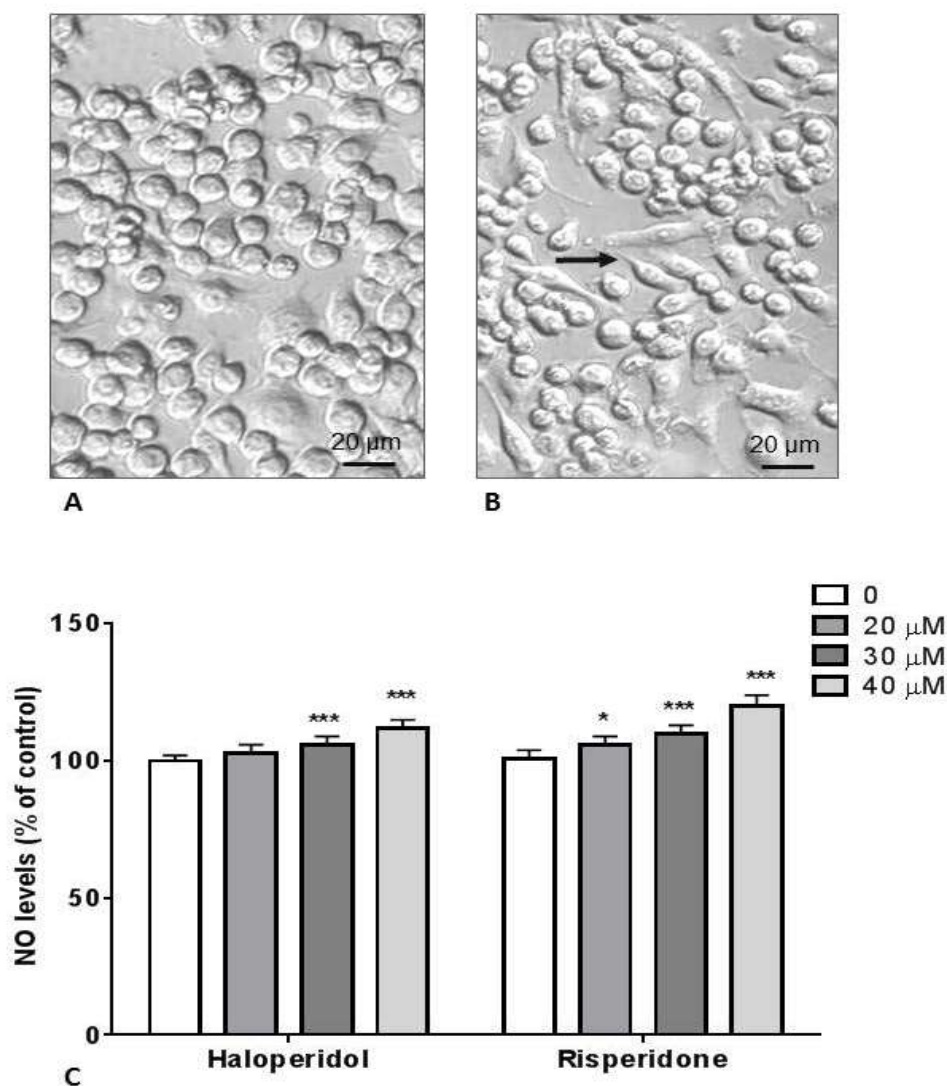


Figure 1- Macrophage activation after 24 h haloperidol and risperidone exposition at different concentrations. (A) RAW 264.7 monocytes inactivated cells (x 40); (B) macrophage activation observed by change of cell morphological patterns (arrow) (x 40); (C) NO levels determined by a modified Griess method that quantify nitrite/nitrate concentrations. Samples were statistically compared by One-way ANOVA analysis followed by *post hoc* Dunnett test. * $p=0.05$; ** $p=0.01$; *** $p= 0.001$.

The haloperidol and risperidone exposition also significantly decreased the macrophage viability ($p < 0.0001$) in 24, 48 and 72 h after exposition when compared to the untreated control group at all concentrations tested here (Figure 2a). These results indicated potential macrophage activation. The effect of antipsychotic drugs was just in cell viability

without direct action on macrophage proliferation since was not detected significant differences in cell cycle (Figure 2b).

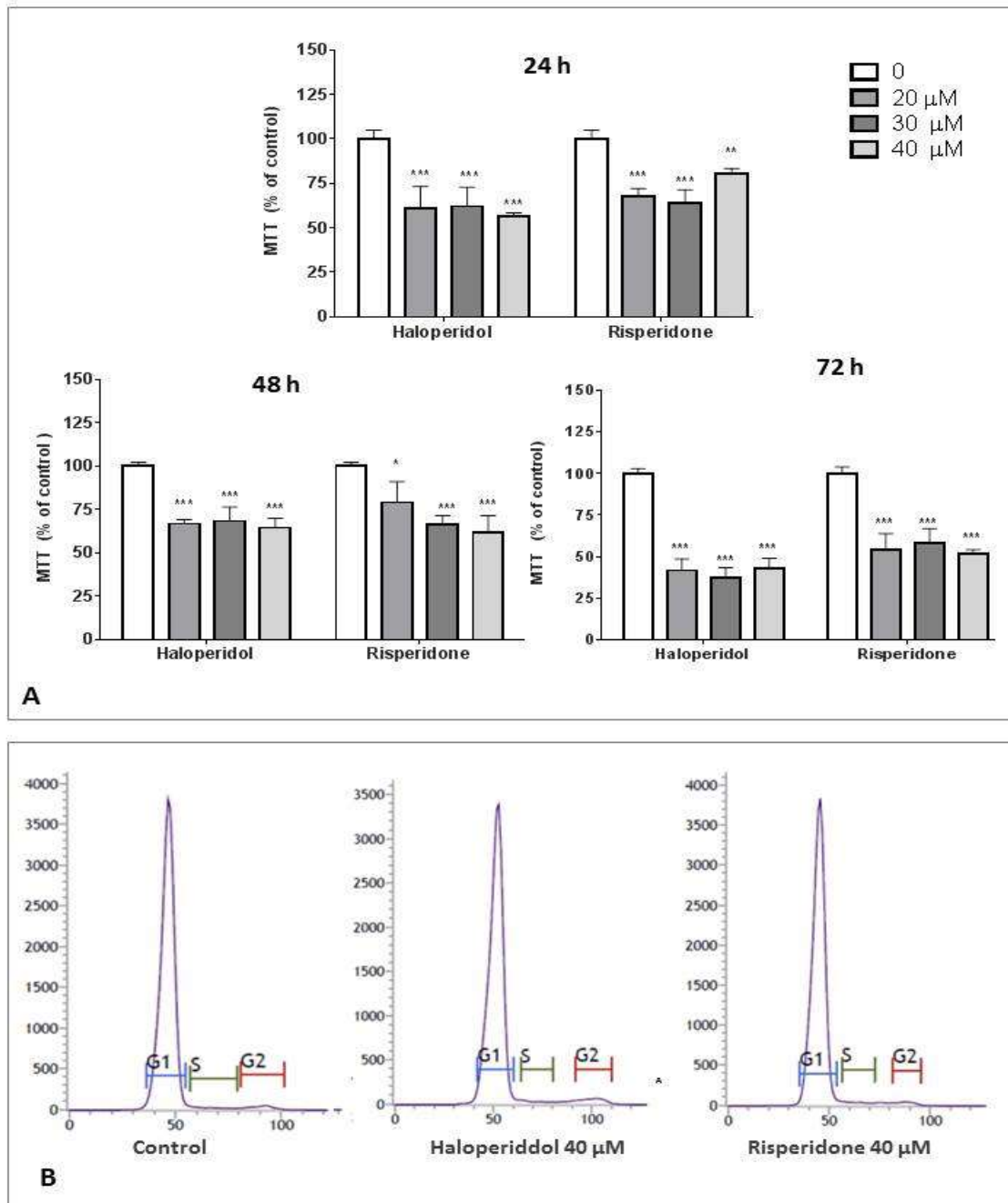


Figure 2 Haloperidol and risperidone effect on macrophage (A) Viability after 24, 48 and 72 h exposition determined by MTT spectrophotometric assay. Results are presented as % of untreated control group. Samples were statistically compared by One-way ANOVA analysis followed by *post hoc* Dunnet test. * $p=0.05$; ** $p=0.01$; *** $p=0.001$. (B) Representative flow cytometry of effect on haloperidol and risperidone effect on cell cycle after 72 h haloperidol and risperidone exposition. G1= interphase; S= DNA synthesis; G2= interphase pre-mitotic phase. Antipsychotic drugs did not alter macrophage cell proliferation.

Generally apoptosis event is triggering in activated macrophages. For this reason, an analysis was performed to evaluate the potential haloperidol and risperidone effect on apoptosis. Flow cytometry analysis using Annexin V as apoptosis marker showed that after 24h exposition just higher haloperidol concentration (40 μ M) increased apoptosis events (215.5 \pm 13.2 % of early apoptosis compared to control group, $p=0.01$). However, all concentrations of risperidone significantly increased apoptosis events ($p=0.001$). Higher levels of early and late apoptosis were observed in macrophages exposed to lower risperidone concentration (20 μ M) (Figure 3).

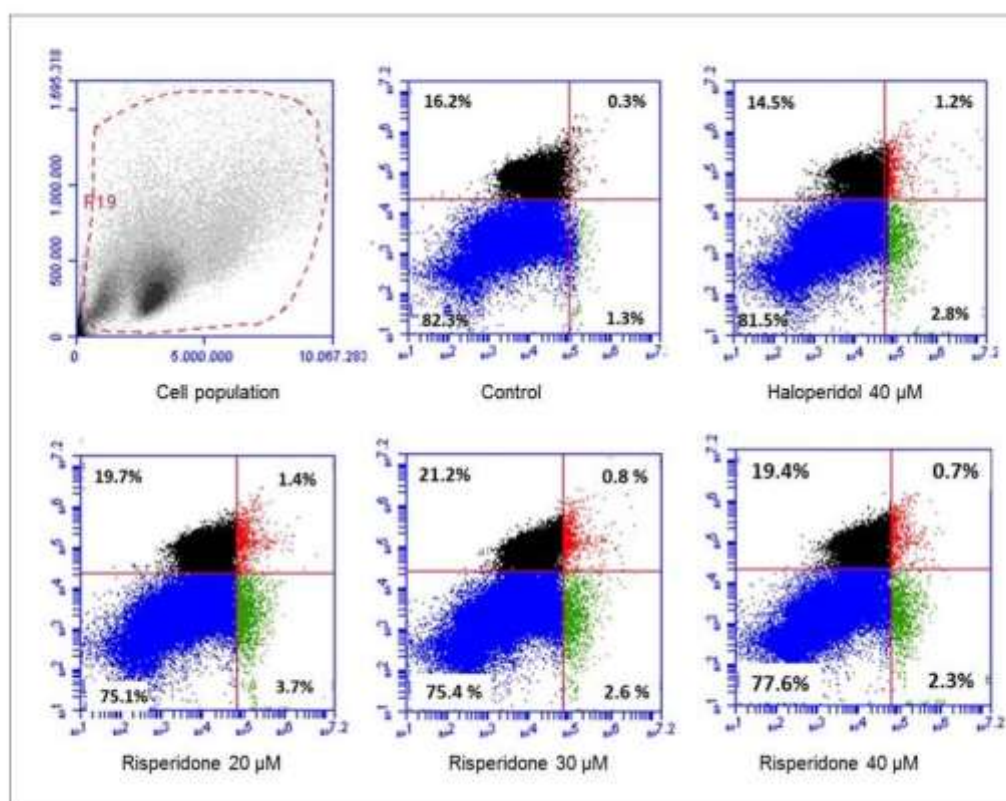


Figure 3 -Representative flow cytometric of haloperidol and risperidone effect after 24 h exposition on apoptosis events of RAW 264.7 macrophages using Annexin V and propidium iodide (PI) identified by different color patterns. Blue= viable cells; green = live cells undergoing early apoptosis; red= dead apoptotic cells; black= necrotic cells. As no differences in the frequency of apoptotic events were detect in cells exposed to 20 μ M and 30 μ M haloperidol the cytometry graphic was omitted.

Analysis of Bcl-2 and BAX genes expression after 24h of antipsychotic exposition was also determined. As can see in Figure 4a, both drugs down regulated the Bcl-2/Bax expression ratio. The low ratio between Bcl-2/BAX indicates cellular apoptosis triggered by haloperidol and risperidone. ($p=0.001$). A significant dose-dependent increase on caspases 3 and 8 levels were observed in cells exposed to both antipsychotic drugs after 72h exposition (Figures 4b,c).

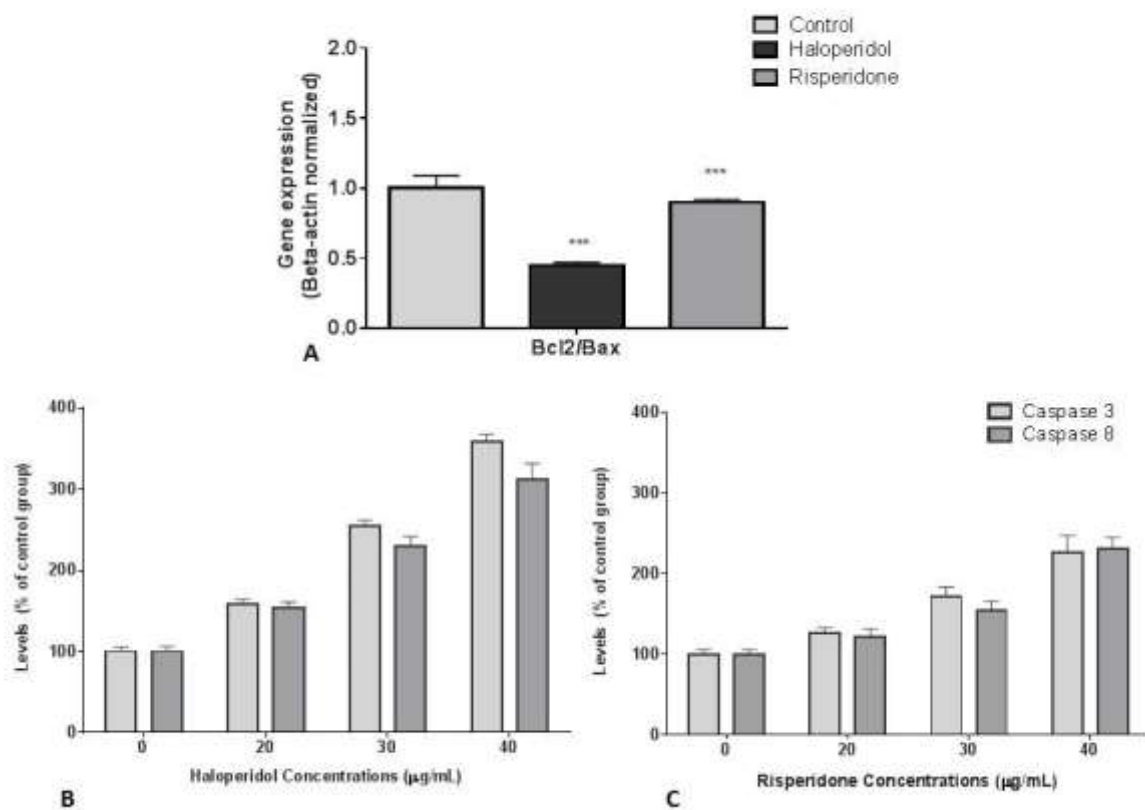


Figure 4- Haloperidol and risperidone ($40\mu\text{M}$) effect on Bcl-2 and BAX gene expression after 24 h exposition and caspases 8 and 3 levels after 72 exposition. (A) Both treatments showed down regulation of Bcl-2 gene and up regulation of BAX gene and the Bcl-2/BAX ratio was low than 1 indicating apoptosis induction by mitochondrial intrinsic via. Samples were statistically compared by One-way ANOVA analysis followed by *post hoc* Dunnet test. * $p=0.05$; ** $p=0.01$; *** $p= 0.001$; (B) haloperidol and risperidone increase caspases 3 and 8 levels measured by ELISA immunoassay in a dose-depend way.

Cytokine levels of non-exposed and exposed macrophages to different haloperidol and risperidone concentrations are presented in Table 1. All concentrations of antipsychotic drugs triggered an increase in inflammatory cytokines in a dose-dependent way and decrease in IL-10 levels, an anti-inflammatory molecule. The inflammatory effect was more intense in cells treated with haloperidol than cells treated with risperidone.

Table 1 Cytokines levels in macrophages treated with 72 h haloperidol and risperidone

Treatments	Cytokines				
	IL -1 (pg/ml) Mean ± SD	IL-6 (pg/ml) Mean ± SD	TNF α (pg/ml) Mean ± SD	INF γ (ug/ml) Mean ± SD	IL-10 (pg/ml) Mean ± SD
Control	25.3 ± 3.7 ^a	35.5 ± 4.9 ^a	47.0 ± 4.0 ^a	54.8 ± 3.7 ^a	65.5 ± 3.7 ^a
Haloperidol 20 μ M	46.3 ± 3.9 ^b	53.8 ± 3.3 ^b	62.8 ± 4.5 ^b	75.0 ± 5.6 ^b	51.8 ± 3.1 ^b
Haloperidol 30 μ M	57.3 ± 3.6 ^c	65.5 ± 7.5 ^c	74.5 ± 6.9 ^c	86.8 ± 7.4 ^c	43.8 ± 3.0 ^c
Haloperidol 40 μ M	75.5 ± 4.7 ^d	87.3 ± 2.8 ^d	96.8 ± 3.9 ^d	115.5 ± 3.1 ^d	30.3 ± 6.7 ^d
Risperidone 20 μ M	28.8 ± 3.8 ^a	40.0 ± 3.9 ^a	53.3 ± 3.0 ^e	60.8 ± 1.7 ^e	55.5 ± 7.2 ^b
Risperidone 30 μ M	39.0 ± 6.5 ^e	47.8 ± 3.8 ^c	63.0 ± 6.5 ^b	71.0 ± 3.6 ^b	45.8 ± 3.5 ^c
Risperidone 40 μ M	64.8 ± 7.3 ^f	87.0 ± 24.7 ^d	97.5 ± 21.4 ^c	124.3 ± 21.4 ^f	34.8 ± 3.9 ^d
<i>p value</i>	≤ 0.001	≤ 0.001	≤ 0.001	≤ 0.001	≤ 0.001

IL= interleukin; INF= interferon; SD= standard deviation; treatments were compared by Anova two-way followed by Bonferroni post hoc test. Different letters indicate significant differences among treatments.

Discussion

The results described here suggested that both antipsychotic drugs are able to activate the classical inflammatory via of isolated macrophages cells, independent of exogenous stimulus from other blood cells and molecules and tecidual microenvironmental conditions. The macrophage activation by haloperidol and risperidone involved an increase in NO levels, decrease in cell viability by apoptosis induction and increase in inflammatory cytokines.

Therefore, we demonstrated here the occurrence of a primary effect of risperidone and haloperidol on macrophage cells.

Recent experimental investigation suggested that drugs such as risperidone increase appetite by upregulation of hypothalamic neuropeptide (Kursungoz et al., 2015) and this mechanism could explain the obesity found in psychiatric patients long-term treated with antipsychiatric drugs. If the Kursungoz et al. (2015) suggestion is correct, we expected that antipsychotic drugs effect on immune cells involved with inflammatory response would be null or lower. However, our data showed an important effect of haloperidol and risperidone on macrophage activation. For this reason, we cannot discard the role inflammation on alteration of endocrine metabolism that leads to obesity and other metabolic dysfunctions.

Haloperidol and risperidone effect on macrophage activation described here corroborates some previous *in vitro* investigations that showed increase of inflammatory cytokines in other cell types such as adipocyte cells and endothelial cells (Sarvári et al., 2014). An investigation performed by Chen et al (2012) also described that risperidone was able to modulate the cytokine and chemokine of dendritic cells and induces neutrophils apoptosis.

Previous investigations using other cells as experimental model have suggested that cytotoxicity induced by haloperidol involves modulation of proteins that are members of the Bcl-2 family, such as Bcl-XS (We et al., 2009). We also observed here antipsychotic drug effects on Bcl-2 and BAX gene expression, indicating that these drugs activate intrinsic apoptosis via.

However, it is important to comment that apoptosis effect triggering by haloperidol and risperidone appear to be dependent of cell type. For example, Seki et al (2013) showed that some atypical antipsychotics such as minocycline and aripiprazole can suppress *in vitro*

oligodendrocyte damage by inhibiting microglial activation and apoptosis suppression of these cells. However, this effect was not observed in cells treated with haloperidol.

Elmorsy et al (2014) showed that some antipsychotics including haloperidol and risperidone can induce apoptosis by increase of caspases 3 and 8 levels of a human brain microvascular endothelial cell that is similar to cells found in blood-brain barrier. Considering macrophages cells, apoptosis induction described here probably is caused by sequence events that are involved to inflammatory activation of these cells, and not by cell damage.

We observed in our experiment that both haloperidol and risperidone were able to modulate macrophage cytokines, increasing IL-1 β , IL-6, TNF α levels and decreasing IL-10 levels. Previous investigations described alterations on immune cells and raised levels of pro-inflammatory molecules, such as cytokines in the serum, plasma, and cerebrospinal fluid of schizophrenic patients and/or patients with acute psychosis, independent of medication (Müller, 2015). Therefore, in both schizophrenia and acute psychosis, there is an activation of circulating monocytes as well as microglia cells. For this reason, Bergink et al (2014) postulated that in schizophrenia disease or acute psychosis events occurs a concomitant increase of proinflammatory cytokines levels in serum. If the haloperidol and risperidone action on macrophages observed here also occurred in in vivo conditions, we can suggest that some antipsychotic drugs can exacerbate or cause chronicity of inflammatory process. This effect could contribute to the development of obesity and other endocrine disturbs.

From the evidence produced until now, it seems likely that haloperidol and risperidone are able to differentially modulate inflammation processes depending on tissue-type. In these terms we cannot discard that antipsychotic drugs cause chronic inflammation on peripherals tissue (fat and blood cells) triggering metabolic disturbs, whereas decreasing chronic inflammation on brain tissue. Despite methodological limitations associated with in vitro portocols, our data corroborates previous evidence suggesting that concomitant treatment of

antipsychotic and antiinflammatory drugs, such as aspirin can improve inflammatory processes found in schizophrenic patients (Sommer et al., 2014).

However, some studies suggest an important anti-inflammatory effect of antipsychotics drugs on microglia that is a major source of neural inflammatory cytokines and oxidative stress (Kato et al., 2011). The potential differences on inflammatory response of these drugs can be attributed to an activation of other immune pathways, such as the inflammatory alternative via that are related to tissue regeneration. However, since our study is limited to macrophage response analysis, future investigations need to be performed to clarify this question.

References

- Al-Amin, M.M., Nasir Uddin, M.M., Mahmud Reza, H., 2013. Effects of antipsychotics on the inflammatory response system of patients with schizophrenia in peripheral blood mononuclear cell cultures. *Clin Psychopharmacol. Neurosci.* 11,144-51.
- Barbisan, F., Motta, J.R, Trott, A., Azzolin, V., Dornelles, E.B., Marcon, M., Algarve, T.D., Duarte, M.M., Mostardeiro, C.P., Unfer, T.C., Schott, K.L., da Cruz, I.B., 2024. Methotrexate-related response on human peripheral blood mononuclear cells may be modulated by the Ala16Val-SOD2 gene polymorphism. *PLoS One.* 9, e107299.
- Bergink, V., Gibney, S.M., Drexhage, H.A., 2014. Autoimmunity, inflammation, and psychosis: a search for peripheral markers. *Biol. Psychiatry.* 15, 324-31.
- Chen, M.L., Tsai, T.C., Wang, L.K., Lin, Y.Y., Tsai, Y.M., Lee, M.C., Tsai, F.M., 2012. Risperidone modulates the cytokine and chemokine release of dendritic cells and induces TNF- α -directed cell apoptosis in neutrophils. *Int. Immunopharmacol.*12,197-204.
- de Witte, L., Tomasik, J., Schwarz, E., Guest, P.C., Rahmoune, H., Kahn, R.S., Bahn, S., 2014. Cytokine alterations in first-episode schizophrenia patients before and after antipsychotic treatment. *Schizophr. Res.* 154,23-9.
- dos Santos Montagner, G.F., Sagrillo, M.R., Machado, M.M., Almeida, R.C., Mostardeiro, C.P., Duarte, M.M., da Cruz, I.B., 2010. Toxicological effects of ultraviolet radiation on lymphocyte cells with different manganese superoxide dismutase Ala16Val polymorphism genotypes. *Toxicol. In Vitro.* 24,1410-6.
- Elmorsy, E., Elzalabany, L.M., Elsheikha, H.M., Smith, P.A., 2014. Adverse effects of antipsychotics on micro-vascular endothelial cells of the human blood-brain barrier. *Brain Res.* 2, 1583:255-68.
- Fonseka, T.M., Tiwari, A.K., Gonçalves, V.F., Lieberman, J.A., Meltzer, H.Y., Goldstein, B.I., Kennedy, J.L., Kennedy, S.H., Müller, D.J., 2015. The role of genetic variation across IL-1 β , IL-2, IL-6, and BDNF in antipsychotic-induced weight gain. *World J. Biol. Psychiatry.*16, 45-56.

- Kato, T.A., Monji, A., Mizoguchi, Y., Hashioka, S., Horikawa, H., Seki, Y., Kasai, M., Utsumi, H., Kanba, S., 2011. Anti-Inflammatory properties of antipsychotics via microglia modulations: are antipsychotics a 'fire extinguisher' in the brain of schizophrenia? *Mini Rev. Med. Chem.* 11, 565-74
- Kursungoz, C., Ak, M., Yanik, T., 2015. Effects of risperidone treatment on the expression of hypothalamic neuropeptide in appetite regulation in Wistar rats. *Brain Res.* 1596, 146-55.
- Medved, V., Jovanović, N., Knapić, V.P., 2009. The comorbidity of diabetes mellitus and psychiatric disorders. *Psychiatr. Danub.* 21, 585-8.
- Monteleone, P., Martiadis, V., Maj, M., 2009. Management of schizophrenia with obesity, metabolic, and endocrinological disorders. *Psychiatr. Clin. North, Am.* 32,775-94.
- Muench, J., Hamer, A.M., 2010. Adverse effects of antipsychotic medications. *Am. Fam. Physician.* 81, 617-22.
- Müller, N., 2014. Immunology of schizophrenia. *Neuroimmunomodulation.* 2014,109-16.
- Noto, C., Ota, V.K., Gouvea, E.S., Rizzo, L.B., Spindola, L.M., Honda, P.H., Cordeiro, Q., Belangero, S.I., Bressan, R.A., Gadelha, A., Maes, M., Brietzke, E., 2014. Effects of Risperidone on Cytokine Profile in Drug-Naïve First-Episode Psychosis. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* (in press).
- Sárvári, A.K., Veréb, Z., Uray, I.P., Fésüs, L., Balajthy, Z., 2014. Atypical antipsychotics induce both proinflammatory and adipogenic gene expression in human adipocytes in vitro. *Biochem, Biophys, Res, Commun.* 8, 1383-9.
- Seki, Y., Kato, T.A., Monji, A., Mizoguchi, Y., Horikawa, H., Sato-Kasai, M., Yoshiga, D., Kanba, S., 2013. Pretreatment of aripiprazole and minocycline, but not haloperidol, suppresses oligodendrocyte damage from interferon- γ -stimulated microglia in co-culture model. *Schizophr. Res.* 151,20-8.

- Sommer, I.E., van Westrhenen, R., Begemann, M.J., de Witte L.D., Leucht, S., Kahn, R.S., 2014. Efficacy of anti-inflammatory agents to improve symptoms in patients with schizophrenia: an update. *Schizophr. Bull.* 40, 181-91.
- Song, X., Pang, L., Feng, Y., Fan, X., Li, X., Zhang, W., Gao, J., Zhang, J., Nemani, K., Zhang, H., Lv, L., 2014. Fat-mass and obesity-associated gene polymorphisms and weight gain after risperidone treatment in first episode schizophrenia. *Behav. Brain. Funct.* 10, 35.
- Wei, Z., Qi, J. Dai, Y., Bowen, W.D., Mousseau, D.D., 2009. Haloperidol disrupts Akt signalling to reveal a phosphorylation-dependent regulation of pro-apoptotic Bcl-XS function. *Cell Signal.*, 21:161-8.

4. DISCUSSÃO

O presente estudo investigou o efeito direto de três diferentes concentrações de haloperidol e risperidona na ativação de macrófagos da linhagem RAW 264.7. Os resultados mostraram que ambos os fármacos (um típico e outro atípico) foram capazes de induzir ativação macrofagocitária já que induziram alterações morfológicas nas células, aumentaram os níveis de óxido nítrico, diminuíram a viabilidade das células via indução da apoptose e aumentaram os níveis de citocininas inflamatórias.

A relevância do estudo do efeito de fármacos antipsicóticos na ativação de macrófagos baseia-se no fato de que estas células possuem um papel crítico na patogênese de muitas doenças, em especial morbididades metabólicas como a obesidade e o diabetes tipo 2 (DEY et al., 2015).

A ação inflamatória destes fármacos em células do sangue periférico sem a influência de outros fatores como substâncias parácrinas produzidas por outras células ou condições microambientais pode ser considerada relevante já que os resultados obtidos sobre a ação dos antipsicóticos sobre a modulação da inflamação até o presente momento são bastante contraditórios.

Esta contradição inclui investigações como a recentemente realizada por Kursongoz e colaboradores (2015) que propôs que o efeito da risperidona que auxiliaria no desenvolvimento da obesidade envolve aumento do apetite via super-regulação do neuropeptídeo hipotalâmico. Os autores também propuseram que o aumento do processo inflamatório seria assim uma decorrência indireta ocasionada pela obesidade dos pacientes psiquiátricos. Se tal sugestão fosse correta, aqui neste estudo não se esperaria resposta direta dos macrófagos a exposição tanto a risperidona quanto ao haloperidol. Por isto, acredita-se que, apesar da contribuição destes fármacos no aumento do apetite parecem que eles também agem como fatores pró-inflamatórios.

Os resultados aqui descritos corroboram estudos *in vitro* que foram previamente conduzidos e que mostraram aumento nos níveis de citocinas inflamatórias em outros tipos celulares, em especial nos adipócitos (SARVARI et al., 2014). Outra investigação conduzida por Chen e colaboradores (2012) também descreveu que a risperidona era capaz de modular diferencialmente citocinas produzidas pelas células dendríticas e induzir apoptose de

neutrófilos. O conjunto destes trabalhos aponta para a ação destes fármacos no metabolismo inflamatório.

Em relação à indução a apoptose observada nos nossos resultados é bom lembrar que macrófagos, uma vez ativados irão desencadear apoptose e morrer. Por este motivo, acredita-se que a queda de viabilidade e modulação da apoptose observada através de diferentes protocolos é uma decorrência do processo de ativação e não de um estímulo citotóxico. Cabe comentar que, em relação à ativação da apoptose não foi possível observar aumento de células marcadas por anexina nas concentrações mais baixas de haloperidol após 24 h de exposição. Entretanto, considerando que tal fármaco foi o que mais causou mortalidade nas células acredita-se que, tais resultados representem apenas uma diferença de velocidade de resposta apoptótica entre as diferentes concentrações e os dois diferentes fármacos. Por este motivo, considerando os resultados obtidos a partir da análise dos níveis de caspases estima-se que todos os tratamentos induziram, em um momento ou outro, a cascata apoptótica.

A apoptose, como é bem sabido é um mecanismo celular altamente controlado e programado. Existem duas vias gerais pelo qual a apoptose é desencadeada. A via extrínseca que envolve a presença de receptores de morte na membrana das células (TNF tipo 1 e Fas) que formam um complexo entre ligante e receptor que ativa a caspase 8 no interior do citoplasma da célula. Esta caspase é considerada uma molécula iniciadora da apoptose porque cliva a pró-caspase 3 que irá desencadear os eventos apoptóticos propriamente ditos (ZHANG, 2011).

A via intrínseca é ativada quando ocorre estresse intracelular como a falta de fatores de crescimento, dano ao DNA, etc. Geralmente, moléculas de proteína p53 estão acomodadas ao DNA via ligação com proteínas específicas como a MDM2 e a MDM4. Quando um agente estressor causa dano no DNA ocorre desacomplamento da p53, que por sua vez inibe a expressão de determinados genes que estão associados à proliferação celular, como é o caso do Bcl-2 e estimulam a expressão de genes pró-apoptóticos como é o caso do BAX. Uma vez desacomplada, a proteína p53 vai para o citoplasma e liga-se a proteína Bax. Este complexo causa formação de poros na membrana mitocondrial que libera para o citoplasma moléculas de citocromo C. Como o citocromo C é produzido pela mitocôndria e permanece no interior desta organela em uma célula funcional, o aumento dos níveis de citocromo C no citoplasma induzem a rota das caspases via ativação das caspases indutoras 8 e 9 que, por sua vez clivam a pró-caspase 3 desencadeando o processo apoptótico propriamente dito. “Assim, a proteína p53 é considerada como a ‘guardiã do genoma’ já que controla o crescimento e divisão

celular bem como induz a apoptose células que possuem danos extensivos no seu DNA que poderiam prejudicar a sua função e o organismo como um todo (LO NIGRO, 2014)

Nesta investigação foi determinado o efeito do tratamento *in vitro* com haloperidol e risperidona sobre a modulação da razão da expressão dos genes Bcl-2/BAX e nos níveis de caspase 8 e 3. Os resultados obtidos indicam que tais fármacos conseguem acionar a via apoptótica intrínseca (mitocondrial). Entretanto, pode também estar havendo modulação da via extrínseca, mas os resultados não permitem uma conclusão específica e este respeito. O mais importante é que investigações prévias usando outras células expostas ao haloperidol também descreveram ação deste psicofarmacológico na modulação de proteínas que são membros da família Bcl-2, como é o caso da proteína pró-apoptótica BAX (WEI et al., 2009).

Porém nem todos os estudos relatam similar ação do haloperidol ou da risperidona na indução de apoptose. Por exemplo, Seki et al (2013) mostraram que alguns antipsicóticos atípicos como é o caso da minociclina e do aripiprazol são capazes de suprimir danos a oligodendrócitos via inibição da ativação da micróglia e supressão da apoptose. Porém estes mesmos autores também relataram que tal efeito não foi observado em oligodendrócitos tratados com haloperidol. Por outro lado, investigações como a realizada por Elmorsy e colaboradores (2014) sugeriram que tanto o haloperidol quanto a risperidona poderiam induzir apoptose de células endoteliais vasculares do cérebro humano que são similares as que compõem a barreira hematoencefálica.

No estudo conduzido tanto o haloperidol quanto a risperidona aumentaram os níveis de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, TNF α e INF γ). Por outro lado ocorreu queda nos níveis da IL-10 que é notadamente uma citocina anti-inflamatória. Assim com base nos resultados obtidos parece que o haloperidol e a risperidona desencadeiam uma resposta imune similar a uma ‘inflamação aguda’ onde ocorre aumento nos níveis de EROs (em especial NO), alteração no padrão morfológico celular, produção de citocinas inflamatórias, diminuição de citocinas anti-inflamatórias e apoptose celular. A única fase da ativação de macrófagos M1 que não foi observada diz respeito à fagocitose que geralmente é feita por estas células. Em uma resposta imunológica ocasionada por lesão tecidual ou mesmo por infecção de microorganismos os macrófagos iram geralmente fagocitar restos de tecidos ou outras células do sistema imune presentes no local da lesão (neutrófilos) ou microorganismos como bactérias, por exemplo. É claro que esta fase da fagocitose não existe nos tecidos periféricos (sangue e adiposo) e, na medida em que os macrófagos foram ativados por agentes químicos e não há, aparentemente nada a ser “realmente fagocitado”. Nestas condições, podemos especular que na ausência do processo de fagocitose poderia impedir ou diminuir a indução da

via alternativa anti-inflamatória que é feita pelos macrófagos M2 e que produz citocinas anti-inflamatórias como a IL-10.

É interessante aqui comentar que o estudo realizado por Kato e colaboradores (2011) descreveu que alguns fármacos antipsicóticos como a risperidona poderiam ter ação anti-inflamatória na micróglia. A micróglia é um tecido composto por células muito similares aos macrófagos e que possuem a mesma origem embrionária. Em pacientes esquizofrênicos ou com psicose aguda, a micróglia apresenta um quadro inflamatório claro com grande produção de citocinas inflamatórias que podem contribuir para o dano e destruição do tecido neural (BERKING et al., 2014; MÜLLER, 2015). Neste caso, a indução inflamatória realizada pelo haloperidol e a risperidona poderia na realidade alavancar uma resposta anti-inflamatória mais intensa o que levaria a uma potencial regeneração do tecido lesado ou diminuição no dano do mesmo. Neste caso, se explicaria porque nos tecidos periféricos a inflamação seria mantida o mesmo não ocorrendo no tecido neural.

Outra hipótese a ser considerada é que, uma vez que estes fármacos são administrados regularmente, este ciclo “de inflamação aguda” se repete de modo continuado criando assim uma situação de inflamação crônica. Portanto, estes fármacos poderiam exacerbar e manter estados inflamatórios periféricos.

De todo modo, a manutenção de estados inflamatórios pelo haloperidol e risperidona poderia ser um dos mecanismos facilitadores para o desenvolvimento de estados de obesidade e de outros distúrbios endócrinos considerando doenças inflamatórias crônicas de baixo grau (TRAYHUM e WOOD, 2004) em pacientes tratados com estes antipsicóticos. Aqui também é importante comentar que existem estudos propondo o uso concomitante de anti-inflamatório com antipsicóticos a fim de minimizar a ação negativa destes fármacos no organismo. Sommer e colaboradores (2014) fez uma meta-análise a este respeito do qual sugeriu que o uso de alguns tipos de anti-inflamatórios, com destaque a aspirina seria benéfico para pacientes esquizofrênicos.

Apesar das limitações metodológicas relacionadas a protocolos experimentais *in vitro* os resultados aqui apresentados sugerem que tanto o haloperidol quanto a risperidona são capazes de ativar macrófagos e desencadear estados inflamatórios. Tais resultados podem contribuir no entendimento da associação entre o uso de longo tempo destes fármacos com o desenvolvimento da obesidade, já que a obesogênese representa um estado continuado de baixo grau de inflamação.

5. CONCLUSÃO

O estudo *in vitro* realizado utilizando a linhagem comercial de macrófagos RAW 264.7 expostos a diferentes concentrações dos fármacos antipsicóticos haloperíдол (típico) e risperidona (atípico) observou que:

- ocorreu diminuição na viabilidade celular após 24, 48 e 72 h da exposição aos fármacos;
- a diminuição da viabilidade envolveu desencadeamento da apoptose que foi confirmada através da observação de um aumento nos níveis de caspase e diminuição da taxa da expressão dos genes Bcl-2/BAX das células expostas ao haloperíдол e risperidona;
- não houve alteração no ciclo celular dos macrófagos expostos aos antipsicóticos;
- ambos os fármacos induziram aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, TNF α , INF γ) e diminuição nos níveis da citocina anti-inflamatória IL-10;
- ambos os fármacos induziram diferenciação celular e aumentaram os níveis de óxido nítrico indicando ativação macrofagocitária;

Considerando os resultados obtidos e que doenças metabólicas, como a obesidade, que estão associadas ao tratamento por antipsicóticos apresentam inflamação crônica de baixo grau, a ativação de estados inflamatórios dos macrófagos pelo haloperíдол e risperidona pode ter algum nível de contribuição com o desenvolvimento destas doenças.

REFERÊNCIAS

- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol.** v. 105, p. 121–126, 1984.
- AGUILAR-VALLES, A. et al. Obesity, adipokines and neuroinflammation. **Neuropharmacology.** 2015 (no prelo).
- AHFS, **Drug Information**, (ed. Gerald K McEvoy), New York, 1997, 3350 p.
- AL-AMIN, M.M. et al. Effects of antipsychotics on the inflammatory response system of patients with schizophrenia in peripheral blood mononuclear cell cultures. **Clin Psychopharmacol. Neurosci.** v.11, p.144-151, 2013.
- ALGARVE, T. D. et al. In vitro effects of Ala16Val manganese superoxide dismutase gene polymorphism on human white blood cells exposed to methylmercury. **Genetics Molecular Research.** v.12, p. 5134-5144, 2013.
- ANANTH, J. et al. Atypical antipsychotic drug use and diabetes. **Psychother Psychosom.** v.71, p. 244-54, 2002.
- ANANTH, J. et al. Atypical antipsychotic drugs, diabetes and ethnicity. **Expert Opin Drug Saf.** v.4, p.1111-1124, 2005.
- ASSOCIAÇÃO AMERICANA DE PSIQUIATRIA, APA. (2002). Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais. (DSM – IV – TR). Porto Alegre: ARTMED.
- AUFFRAY, C., et al. Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. **Science.** v.317, p.666-670, 2007.
- BALDESSARINI, R.J.; TARAZI, F.I. Brain dopamine receptors: a primer on their current status, basic and clinical. **Harv Rev Psychiatry.** v. 3, p.301-325, 1996.
- 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, p.107-119, 2014.
- BERKING, V.; GIBNEY, S.M.; DREXHAGE, H.A. Autoimmunity, inflammation, and psychosis: a search for peripheral markers. **Biol. Psychiatry.** v.15, p.324-31, 2014.
- BEUREL, E.; JOPE, R.S. The paradoxical pro- and anti-apoptotic actions of GSK3 in the intrinsic and extrinsic apoptosis signaling pathways. **Progress in Neurobiol.** v.79, p.173-189, 2006.
- BODÉN, R. E. G. comparison of cardiovascular risk factors for ten antipsychotic drugs in clinical practice. **Neuropsychiatr Dis Treat.** v.9, p.371-377, 2013.

BRIDLER, R. ;UMBRICHT D. Atypical antipsychotics in the treatment of schizophrenia. **Swiss Med Wkly**. v.133, p.63-76, 2003.

McGARRY, K. J. **Da documentação à informação: um contexto em evolução**. Lisboa: Presença, 1984. 195 p.

BRUNTON, L.L.;LAZO,J.S.; PARKER, K.L. **Goodman e Gilman. As bases farmacológicas da terapêutica**. Rio de Janeiro, 2007, 1821p.

CASEY, D.E. Metabolic issues and cardiovascular disease in patients with psychiatric disorders. **Am J Med**. v.2, p.15S-22S, 2005.

CHEN, B. et al. A. Hypoxia dysregulates the production of adiponectin and plasminogen activator inhibitor-1 independent of reactive oxygen species in adipocytes. **Biochem Biophys Res Commun**. v.341, p.549-556, 2006.

CHEN, M.L. et al. Risperidone modulates the cytokine and chemokine release of dendritic cells and induces TNF- α -directed cell apoptosis in neutrophils. **Int. Immunopharmacol**. v.12,p.197-204, 2012.

CRUVINEL, W.M. et al. Natural Regulatory T cells in Rheumatic Diseases. **Rev Bras Reumatol** . v.48, p.342-355, 2008.

DAVIDSON, M. Risk of cardiovascular disease and sudden death in schizophrenia. **J Clin Psychiatry**. v.9, p.5-11, 2002.

DE WITTE, L. Cytokine alterations in first-episode schizophrenia patients before and after antipsychotic treatment. **Schizophr. Res**.v.154, p.23-29, 2014.

DEL-ÁNGEL, M. et al. Anti-inflammatory effect of natural and semi-synthetic phthalides. **Eur J Pharmacol**. (no prelo) 2015.

DEY, A.; ALLEN, J.; HANKEY-GIBLIN, P.A. Ontogeny and polarization of macrophages in inflammation: blood monocytes versus tissue macrophages. **Front Immunol**. v.22, p. 675-683, 2015.

DESRUISSEAU, N.S. et al. Adipocyte, adipose tissue and infectious diseases. **Infection and Immunity**. v. 75, n.3, p. 1066-1078, 2007.

dos SANTOS MONTAGNER, G.F. et al. Toxicological effects of ultraviolet radiation on lymphocyte cells with different manganese superoxide dismutase Ala16Val polymorphism genotypes. **Toxicol. In Vitro**. v. 24, p.1410-1416, 2010.

DWYER , D.S. et al. Glucose metabolism in relation to schizophrenia and antipsychotic drug treatment. **Ann Clin Psychiatry**. v.13, p.103-113, 2001.

ELMORE, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. **Toxicologic Pathology**. v. 35, p.496-515, 2007

ELMORSY, E. et al. Adverse effects of antipsychotics on micro-vascular endothelial cells of the human blood-brain barrier. **Brain Res.**v.1583, p.255-268, 2014

FAHY, R.J.; DOSEFF, A.I.; WEWERS, M.D. Spontaneous human monocyte apoptosis utilizes a caspase-3-dependent pathway that is blocked by endotoxin and is independent of caspase-1. **J Immunol.** v.163, p.1755–1762, 1999.

FONSEKA, T. M. et al. The role of genetic variation across IL-1 β , IL-2, IL-6, and BDNF in antipsychotic-induced weight gain. **World J. Biol. Psychiatry.**v.16, p.45-56, 2015.

FUKUHARA, A. Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. **Science.** v.307, p.426-430, 2005.

GLARE, P. Treating nausea and vomiting in palliative care: a review. **Clin Interv in Aging.**v.6, 2011.

GORDON, S. Alternative activation of macrophages. **Nat Rev Immunol.** v.3, p.23-35, 2003.

GORENSTEIN, C.; SCAVONE, C. Avanços em psicofarmacologia - mecanismos de ação de psicofármacos hoje. **Rev. Bras. Psiquiatr.** v.21, n.1, p. 64-73, 1999.

GRUND, S.M.et al. for the Conference Participants. Definition of metabolic syndrome: report of the National, Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. **Circulation.**v. 109, p.433-438, 2004.

HACKER, H. et al. Caspase-9/-3 activation and apoptosis are induced in mouse macrophages upon ingestion and digestion of Escherichia coli bacteria.**J Immunol.** v.169, p.3172-3179, 2002.

HARTLING, L.et al. Antipsychotics in adults with schizophrenia: comparative effectiveness of first-generation versus second-generation medications: a systematic review and meta-analysis. **Ann Intern Med.** v. 57, p.498-511, 2012.

HEYKANTS, J. et al.The pharmacokinetics of risperidona in humans: a summary. **J Clin Psychiatry.** v. 55, p. 13-17, 1994.

HUTLEY, L.; PRINS, J.B. Fat as an endocrine organ: relationship to the metabolic syndrome. **Am J Med Sci.** v.330, p.280-289, 2005.

JUNG, J.Y. et al. In vitro and in vivo immunostimulatory activity of an exopolysaccharide-enriched fraction from Bacillus subtilis. **J Appl Microbiol.** (no prelo), 2015.

KAPUR, S.; REMINGTON, G. Atypical antipsychotics: new directions and new challenges in the treatment of schizophrenia. **Annu Rev Med.**v.52, p.503-517, 2001.

KARABAY , A.Z. et al. Methylsulfonylmethane modulates apoptosis of LPS/IFN- γ -activated RAW 264.7 macrophage-like cells by targeting p53, Bax, Bcl-2, cytochrome c and PARP proteins. **Immunopharmacol Immunotoxicol.** v.36, p.379-389, 2014.

KATO, T.A. et al. Anti-Inflammatory properties of antipsychotics via microglia modulations: are antipsychotics a 'fire extinguisher' in the brain of schizophrenia? **Mini Rev. Med. Chem.** v.11, p.565-74, 2011.

KIRSCHNEK, S. et al. Phagocytosis-induced apoptosis in macrophages is mediated by up-regulation and activation of the Bcl-2 homology domain 3-only protein Bim. **J Immunol.** v.174, p.671-679, 2005.

KLINGER, G. Antipsychotic drugs and breastfeeding. **Pediatr Endocrinol Rev.** v.10, p.308-317, 2013.

KUDO, S.; ISHIZAKI, T. Pharmacokinetics of haloperidol: an update. **Clin Pharmacokinet.** v.37, p.435-456, 1999.

KURSUNGOZ, C.; AK, M.; YANIK, T.. Effects of risperidone treatment on the expression of hypothalamic neuropeptide in appetite regulation in Wistar rats. **Brain Res.** v.1596, p.146-55, 2015.

LINDNER, L.M. Economic evaluation of antipsychotic drugs for schizophrenia treatment within the Brazilian Healthcare System. **Rev Saude Publica.** v.1, p.62-69, 2009.

LIU-SEIFERT, H. Change in level of productivity in the treatment of schizophrenia with olanzapine or other antipsychotics. **BMC Psychiatry** . v.11, p. 87-96 , 2011.

LLERENA, A. et al. Pharmacogenetics of clinical response to risperidone. **Pharmacogenomi.** v.14, p.177-179, 2013.

LO NIGRO , C. New insights into p53 signalling and cancer: implications for cancer therapy. **Journal of tumor.** v. 2, n. 1, 2014.

MAILMAN, R.B.; MURTHY, V. Third generation antipsychotic drugs: partial agonism or receptor functional selectivity? **Curr Pharm Des.** v. 16, p.488–501, 2010.

MARGONATO, F.B.; BONETTI, M.F.S.; NISHIYAMA, P. Haloperidol e sintomas extrapiramidais. Reações adversas ao haloperidol. **Infarma.** v. 16, p.81-84, 2004.

MARI, J.J.; LEITÃO, R. J. A epidemiologia da esquizofrenia. **Rev. Bras. Psiquiatr.** v.22, p. 15-17, 2000.

MAURO, C. Metabolic syndrome and the immunological affair with the blood-brain barrier. **Front Immunol.** v.5, p.677, 2015.

MEDVED, V.; JOVANOVIĆ, N.; KNAPIĆ, V.P. The comorbidity of diabetes mellitus and psychiatric disorders. **Psychiatr. Danub.** v.21, p.585-588, 2009.

MENEZES, P.R. Princípios de epidemiologia psiquiátrica. **Manual de psiquiatria.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan p.43-55, 1996.

MILLER, B.J. et al. Meta-analysis of cytokine alterations in schizophrenia: clinical status and antipsychotic effects. **Biol Psychiatry.** v.70, p.663-671, 2011

- MOHAMED-ALI , V.; PINKNEY, J.H.; COPPACK,S.W. Adipose tissue as an endocrine and paracrine organ. **Int J Obes Relat Metab Disord**.v.22, p.1145-1155, 1998.
- MONTELEONE, P.; MARTIADIS, V.; MAJ , M. Management of schizophrenia with obesity, metabolic, and endocrinological disorders. **Psychiatr. Clin. North, Am.** v.32, p.775-794, 2009.
- MOREIRA, F. A.; GUIMARRÃES, F.S. mechanisms of antipsychotic medications: dopaminergic hypotheses. **Psychiatric Assoc.** v.40, p.63-71, 2007.
- MUENCH, J.; HAMER, A.M. Adverse effects of antipsychotic medications. **Am. Fam. Physician**.v.81, p. 617-622, 2010.
- MÜLLER, N.. Immunology of schizophrenia. **Neuroimmunomodulation**.v.21, p.109-16, 2014.
- MUTCH, N.J.; WILSON, H.M.; BOOTH, N.A. Plasminogen activator inhibitor-1 and haemostasis in obesity. **Proc Nutr Soc.** v.60, p.341-347, 2001.
- NIKOLOPOULOU, A.; KADOGLU, N.P. Obesity and metabolic syndrome as related to cardiovascular disease. **Expert Rev Cardiovasc Ther.**v.10, p.933-939, 2012.
- NOTO, C. et al. Effects of Risperidone on Cytokine Profile in Drug-Naïve First-Episode Psychosis. **Int. J. Neuropsychopharmacol.** (no prelo), 2014.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. 1993. **Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados à Saúde _ Décima Revisão (CID-10)**, São Paulo, EDUSP/ Centro Colaborador da OMS para Classificação de Doenças e Problemas Relacionados à Saúde.
- RAMOS, M.G.; ROCHA, F.L. Eficácia e segurança dos antipsicóticos atípicos nas demências: uma revisão sistemática. **J. Bras. Psiquiatr.** v. 55, p.34-42, 2006.
- Raschke, W.C. et al. Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus. **Cell.** v.15, p. 261-267,1978.
- RIEDEL, M.; SCHARZ, M.J.; STRASSNIG, M . Risperidone plasma level, clinical response and side-effects. **Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.** v. 255, p.261-268, 2005.
- SARVARI , A.K. et al. Atypical antipsychotics induce both proinflammatory and adipogenic gene expression in human adipocytes in vitro. **Biochem, Biophys, Res, Commun.** v.8,p.1383-1389, 2014.
- SAVILL, J.; FADOK, V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. **Nature**.v.407, p.784-788, 2000.
- SCHATZBERG, A.F.; COLE, J.O.; DEBATTISTA, C. **Manual of Clinical Psychopharmacology.** Washington, 2007.

SEKI, Y. et al. Pretreatment of aripiprazole and minocycline, but not haloperidol, suppresses oligodendrocyte damage from interferon- γ -stimulated microglia in co-culture model. **Schizophr. Res.** v.151, p.20-28, 2013.

SELMENCI, L. et al. Advanced oxidation protein products (AOPP) for monitoring oxidative stress in critically ill patients: a simple, fast and inexpensive automated technique. **Clin Chem Lab Med.** v.43, p. 294–297, 2005.

SERTIÉ, A.L. et al. Effects of antipsychotics with different weight gain liabilities on human in vitro models of adipose tissue differentiation and metabolism. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.** v.35, p.1884-1890, 2011.

SOMMER, I.E. et al. Efficacy of anti-inflammatory agents to improve symptoms in patients with schizophrenia: an update. **Schizophr. Bull.** v.40, p.181-191, 2014.

SONG, X. et al. Fat-mass and obesity-associated gene polymorphisms and weight gain after risperidone treatment in first episode schizophrenia. **Behav. Brain. Funct.** v.10, p.35-40, 2014.

STEPHAN, C.M.; LAZAR, M.A. The current biology of resistin. **J Intern Med.** v.255, p.439-447, 2004.

STOUT, R.D.; SUTTLES, J. Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments. **J Leukoc Biol.** v.76, p.509-513, 2004.

TATSCH, E. et al. A simple and inexpensive automated technique for measurement of serum nitrite/nitrate. **Clin. Biochem.** v.44, p.348–350, 2011.

TRAYHURN, P.; WOOD, I.S. Signalling role of adipose tissue: adipokines and inflammation in obesity. **Biochem Soc Trans.** v.33, p.1078-1081, 2005.

VESTRI, H.S. et al. Atypical antipsychotic drugs directly impair insulin action in adipocytes: effects on glucose transport, lipogenesis, and antilipolysis. **Neuropsychopharm.** v.32, p.765-772, 2007.

WOOD, I.S.; STEZHKA, T.; TRAYHURN, P. Modulation of adipokine production, glucose uptake and lactate release in human adipocytes by small changes in oxygen tension. **Pflugers Arch.** v.462, p.469-477, 2011.

WEI, Z. et al. Haloperidol disrupts Akt signalling to reveal a phosphorylation-dependent regulation of pro-apoptotic Bcl-XS function. **Cell Signal.** v.21, p.161-168, 2009.

WIKTOR-JEDRZEJCZAK, W.; GORDON, S. Cytokine regulation of the macrophage (M ϕ) system studied using the colony stimulating factor-1-deficient op/op mouse. **Physiol Rev.** v.76, p.927-947, 1996.

WONG, R.S. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. **J Exp Clin Cancer Res.** v.26, p. 30-87, 2011.

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

ZHANG, Y et. al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature.** v. 372, p.425 – 432, 1995.

ZHANG, H. et al. Functional complementation between FADD and RIP1 in embryos and lymphocytes. **Nature.** v.471, p.373–376, 2011.