



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE FARMÁCIA

Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso



**Os Efeitos da Amantadina como Terapia Adjuvante aos Antipsicóticos no Tratamento da Esquizofrenia: Ensaio Clínico Randomizado, Duplo-Cego, Controlado com Placebo.**

Eduarda Dias da Rosa

Porto Alegre, Novembro de 2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE FARMÁCIA

Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso

**Os Efeitos da Amantadina como Terapia Adjuvante aos Antipsicóticos no Tratamento da Esquizofrenia: Ensaio Clínico Randomizado, Duplo-Cego, Controlado com Placebo.**

Eduarda Dias da Rosa

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial para obtenção do título de Farmacêutico, pelo curso de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dra. Clarissa Severino Gama

Co-orientador: Bruna Schilling Panizzutti

Porto Alegre, Novembro de 2014

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, Bento e Carmen, pelo amor, confiança e apoio oferecidos durante toda minha vida. Por serem meu exemplo de força, perseverança, coragem e vontade de ir sempre além. Sem vocês, nada seria possível.

À minha irmã, Josiele, por estar sempre ao meu lado, ser minha segunda mãe, cuidar, aconselhar, e por me dar todo o suporte e dividir comigo seus conhecimentos de farmacêutica durante todo o curso.

Aos meus colegas de faculdade – Fernanda, Lucas, Laura, Ágata, Jéssica, Eduardo, Tatiane – que tornaram os dias de estresse e tensão mais leves, com boas conversas, brigas, risadas e festas.

Aos meus colegas do Laboratório de Psiquiatria Molecular, sempre solícitos, disponíveis para ensinar e ensinar sempre que for preciso. Além de grandes amigos são grandes profissionais. Uma honra poder aprender e conviver com vocês.

À minha orientadora, Clarissa, agradeço pela oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa, pela orientação, ensinamentos e disponibilidade.

À minha co-orientadora, Bruna, que mesmo longe foi fundamental para que eu conseguisse escrever este trabalho. Obrigada pela atenção, pelo tempo, pelas ideias e pela amizade.

## RESUMO

**Introdução:** A etiologia da esquizofrenia ainda continua incerta, mas muito já se conhece sobre a sua fisiopatologia. A hipótese de hiperfunção dopaminérgica ainda é a mais aceita, porém limitações nessa teoria levaram a investigação de alterações nas funções glutamatérgicas. A maioria das hipóteses glutamatérgicas estão relacionadas à hipofunção dos receptores NMDA. Amantadina foi inicialmente descoberta como medicamento antiviral, mas é reconhecida também por sua ação antiparkinsoniana. Apesar do seu mecanismo de ação exato não ser totalmente esclarecido, vários estudos demonstram que este fármaco age aumentando a liberação de dopamina, devido à sua ação de antagonista não competitivo dos receptores de glutamato tipo NMDA. **Objetivo:** Verificar se a amantadina quando usada como terapia adjuvante aos antipsicóticos, em pacientes esquizofrênicos, interfere nos sintomas negativos e positivos e nos níveis séricos dos biomarcadores relacionados com a esquizofrenia. **Método:** 20 pacientes, portadores do Diagnóstico de Esquizofrenia pelos critérios DSM-IV, foram randomizados em um ensaio clínico duplo-cego controlado com placebo. A avaliação destes pacientes foi realizada ao longo de 12 semanas, sendo aplicada a escala BPRS e o sangue venoso periférico coletado para análises bioquímicas. Foram avaliados níveis séricos de Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF), Glutathione Peroxidase (GPx), Glutathione Redutase (GR), Glutathione S-Transferase (GS-T), quimiocinas (CCL11 e CCL24), acetilcolinesterase (AChE), Conteúdo de Proteínas Carboniladas (PCC) e Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS). A análise estatística foi realizada utilizando *General Linear Model*, para controlar o efeito do tratamento nos sintomas. Teste-T de Student e Mann-Whitney para variáveis descritivas. Foram considerados significativos  $p < 0,05$ . **Resultados:** O tratamento adjuvante com amantadina apresentou uma redução significativa nos sintomas de psicopatologia geral da escala BPRS ( $p < 0,001$ ) e nos sintomas negativos ( $p = 0,015$ ), mas o mesmo não se aplica para os sintomas positivos ( $p = 0,198$ ). Não houve alteração significativa dos parâmetros séricos avaliados, exceto o índice de proteínas carboniladas ( $p = 0,020$ ). **Conclusões:** Os dados sugerem o papel da amantadina na atenuação dos sintomas negativos e cognitivos da esquizofrenia, com base no aumento da concentração de dopamina na via mesocortical, característica da hipofuncionalidade na doença. Além de propor a contribuição deste fármaco para o aumento da oxidação proteica nos pacientes devido ao aumento da concentração de dopamina. Contudo mais estudos com um maior tempo de seguimento são necessários para determinar a eficácia da amantadina, seu papel a longo prazo no tratamento adjuvante aos antipsicóticos, bem como a dosagem mais eficaz e duração do tratamento na esquizofrenia.

**Palavras-chave:** esquizofrenia, amantadina, receptores NMDA, modulador dopaminérgico, estresse oxidativo.

## ABSTRACT

**Introduction:** Although the etiology of schizophrenia is still uncertain, much is already known about its pathophysiology. The hypothesis of dopaminergic hyperfunction still is the most accepted, nevertheless limitations of this theory led to the investigation of changes in glutamatergic function. The glutamatergic hypothesis is related to NMDA receptor hypofunction. Amantadine was initially discovered as an antiviral drug, but is also recognized for its antiparkinson action. Despite the fact that its mechanism of action is not totally clear, several studies demonstrated that this drug acts by increasing the release of dopamine, due to its action as a noncompetitive antagonist of NMDA receptors. **Objective:** To investigate if amantadine as an adjunctive therapy to commonly used antipsychotics alleviates the positive and negative symptoms and changes serum levels of biomarkers associated with schizophrenia. **Methods:** Twenty patients, with diagnosis of schizophrenia by DSM-IV criteria, were randomized in a double-blind placebo-controlled clinical trial. The evaluation of patients was conducted along 12 weeks, the BPRS scale was applied and peripheral venous blood was collected for biochemical analysis. Serum levels of Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF), Glutathione Peroxidase (GPx), Glutathione Reductase (GR), Glutathione S-Transferase (GS-T), chemokines (CCL11 and CCL24), acetylcholinesterase (AChE), Protein Carbonyl Content (PCC) and Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) were evaluated. Statistical analysis was performed using General Linear Model to control the effect of treatment on symptoms. Student T-test and Mann-Whitney test was performed for the analyses of descriptive variables. P values <0.05 were considered to be significant. **Results:** Adjuvant treatment with amantadine showed a significant reduction in symptoms of general psychopathology BPRS ( $p < 0.001$ ) and negative symptoms scale ( $p = 0.015$ ), but the same didn't occur for the positive symptoms ( $p = 0.198$ ). There was no significant change in biomarkers serum levels evaluated except the PCC levels ( $p = 0.020$ ). **Conclusions:** These data suggest the role of amantadine in mitigating the negative symptoms of schizophrenia, based on the increased concentration of dopamine in the mesocortical pathway. In addition, this suggest the contribution of the drug to increased protein oxidation in patients due to increased concentration of dopamine. However further studies with longer follow-up are needed to determine the efficacy of amantadine, its role in long-term adjuvant to antipsychotic treatment, as well as the most effective dosage and duration of treatment in schizophrenia.

**Keywords:** schizophrenia, amantadine, NMDA receptors, dopamine modulator, oxidative stress.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	6
1.1. Definição e epidemiologia .....	6
1.2. Manifestações clínicas .....	7
1.3. Diagnóstico .....	9
1.4. Neurobiologia da esquizofrenia .....	10
1.5. Biomarcadores na esquizofrenia .....	13
1.6. Tratamento .....	16
1.7. Amantadina .....	18
2. OBJETIVOS.....	21
2.1. Objetivos específicos: .....	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	22
3.1. Amostra.....	22
3.2. Condução do estudo .....	22
3.3. Análises bioquímicas .....	23
3.3.1. Carbonil.....	23
3.3.2. Proteínas .....	23
3.3.3. TBARS .....	23
3.3.4. Quimiocinas: Eotaxina/CCL11 e Eotaxina-2/CCL24 .....	24
3.3.5. BDNF .....	24
3.3.6. Acetilcolinesterase .....	24
3.3.7. Glutathione Peroxidase (GPx).....	25
3.3.8. Glutathione Redutase (GR) .....	25
3.3.9. Glutathione S-Transferase (GST).....	25
3.4. Análise estatística .....	26
4. RESULTADOS.....	27
5. DISCUSSÃO.....	31
6. REFERÊNCIAS .....	36

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Definição e epidemiologia

A esquizofrenia é uma doença mental altamente debilitante que prejudica o funcionamento mental e social. Representa um sério desafio para a psiquiatria e neurociência, bem como para os sistemas de saúde e para os pacientes e familiares que sofrem com esta doença incapacitante. Essa complexa doença se caracteriza por profundos distúrbios de percepção, cognição, emoção e função social (SCHULTZ, 2007).

Estudos de prevalência mostram que 1% da população mundial é acometida pela esquizofrenia (SCHULTZ, 2007; MASSUDA *et al.*, 2013). De acordo com meta-análise realizada por McGrath e colaboradores (2004), a taxa média de incidência da doença é de 15,2 a cada 100 mil pessoas por ano. No Brasil, a taxa de incidência para homens é de 1,9 a 3,9 por 10.000 habitantes e para as mulheres é de 1,8 a 3,2 (MASSUDA *et al.*, 2013), sendo esta taxa maior em homens do que em mulheres, mais elevadas em áreas urbanas em comparação com áreas rurais, e maiores em imigrantes em comparação com indivíduos nativos (MCGRATH, 2004). O começo da doença é mais precoce para o sexo masculino, emergindo tipicamente no fim da adolescência e início da vida adulta (SCHULTZ, 2007). Novos casos, antes da puberdade e após os 50 anos, são raros. Em relação às mulheres, um melhor prognóstico e uma melhor adaptação social é possível devido a um curso mais brando da doença (MARI, 2000). No entanto, estas apresentam um segundo pico de incidência após os 40 anos de idade (MASSUDA *et al.*, 2013). O que torna a diferença de gêneros fundamental para determinar o melhor tratamento.

O histórico familiar é um fator de risco muito significativo (SCHULTZ, 2007; MASSUDA *et al.*, 2013), ou seja, a esquizofrenia possui um substancial componente genético, apresentando uma alta herdabilidade (mais de 80%). O risco genético para a doença é composto tanto por alterações em vários genes, cada uma com um pequeno efeito, mas com um grande impacto, bem como pela interação com fatores ambientais (HALLER, 2014). Entre os fatores ambientais mais importantes descritos, estão o uso da *cannabis* e a idade paterna avançada, além da variação sazonal em relação ao nascimento e eventos estressores na infância (MASSUDA *et al.*, 2013). Neste contexto, eventos como processos inflamatórios,

alterações de membrana celular e estresse oxidativo, estão fortemente ligados às hipóteses etiopatogênicas da esquizofrenia (DIWADKAR, 2014).

Doenças cardiovasculares são a causa mais comum de morte entre os pacientes com esquizofrenia, visto que estes apresentam um risco de desenvolver essas doenças duas vezes maior que a média da população. Isso pode ser exacerbado pelo estilo de vida sedentário e pelo fumo, tendo em vista que os pacientes esquizofrênicos fumam mais em comparação com portadores de outras doenças mentais. Suicídios podem representar até 28% das causas de morte, podendo ocorrer em qualquer fase da doença, mais prevalentemente nos primeiros seis meses após o primeiro episódio (SCHULTZ, 2007; MASSUDA *et al.*, 2013).

## **1.2. Manifestações clínicas**

A esquizofrenia é considerada uma síndrome (INSEL, 2010) cujos sintomas podem ser divididos em dois grandes grupos: positivos (psicóticos) e negativos (SCHULTZ, 2007; MASSUDA *et al.*, 2013; NARDI, 2014). Os sintomas positivos são alterações qualitativas em relação ao normal, que podem ser subdivididos em dois tipos: psicóticos e de desorganização, conforme descrito na Tabela 1. Incluem alucinações, percepções irreais de audição, delírios, comportamento amplamente desorganizado, agitação extrema, com perda do juízo crítico da realidade, ou seja, reflete um excesso e distorção de certas funções. Já os sintomas negativos aparentam uma diminuição ou perda de funções mentais, como por exemplo, embotamento afetivo, falta de motivação e iniciativa, apatia, alogia, avolição, indiferença emocional, entre outros (SCHULTZ, 2007; MASSUDA *et al.*, 2013; APA, 1994). Os pacientes com esquizofrenia apresentam déficit em vários domínios cognitivos, sendo acentuados nos domínios de atenção/vigilância, linguagem, percepção, fluência verbal, aprendizagem, memória, funcionamento executivo e processamento de informações. Além do déficit na cognição social, que é à base das interações sociais, interferindo na percepção das emoções, na resolução de problemas e na aptidão social (VAZ-SERRA, 2010).

O início da doença é variado, podendo ter um início agudo ou um longo pródromo (SCHULTZ, 2007; MASSUDA *et al.*, 2013). Apesar de os sintomas surgirem entre o fim da adolescência e o início da fase adulta, muitos estudos sugerem se tratar de um transtorno neurodesenvolvimental, iniciando a trajetória sequencial da doença pela fase pré-morbida, na qual é possível perceber déficit cognitivo, motor e social, principalmente na infância.



Tabela 1. Classificação dos sintomas típicos da esquizofrenia.

Positivos		Negativos
Psicóticos	De desorganização	
Alucinação	Desagregação do pensamento	Embotamento afetivo
Delírio	Bloqueio do pensamento	Anedonia
Alterações da consciência da atividade do eu:	Alterações da consciência da unidade do eu:	Hipobolia
Roubo do pensamento	Dupla orientação	Pensamento empobrecido
Imposição do pensamento	Paratimia	Déficit de atenção
Sensações corporais impostas	Ambitimia	
	Ambitendência	
Alterações da consciência da identidade do eu:	Sinais catatônicos:	
Despersonalização	Negativismo	
	Obediência automática	
	Flexibilidade cerácea	
Alterações da consciência dos limites do eu:	Estereotipias	
Apropriação	Maneirismos	
Transitivismo	Fenômenos em eco	
Publicação do pensamento	Agitação	
	Estupor	

Fonte: Adaptado de NARDI, 2014.

A fase prodrômica já caracteriza sinais e sintomas da esquizofrenia, como declínio funcional e sintomas psicóticos atenuados (MASSUDA *et al.*, 2013). Estudos realizados por Hänfner & Maurer (2006), sugerem que o início dos sintomas negativos tende a ocorrer 5 anos antes do primeiro episódio psicótico. O primeiro episódio psicótico caracteriza o início da doença, conhecido como período de diagnóstico recente ou estágio inicial. Após esse período há graus variáveis de recuperação dos prejuízos cognitivos e funcionais (Figura 1).

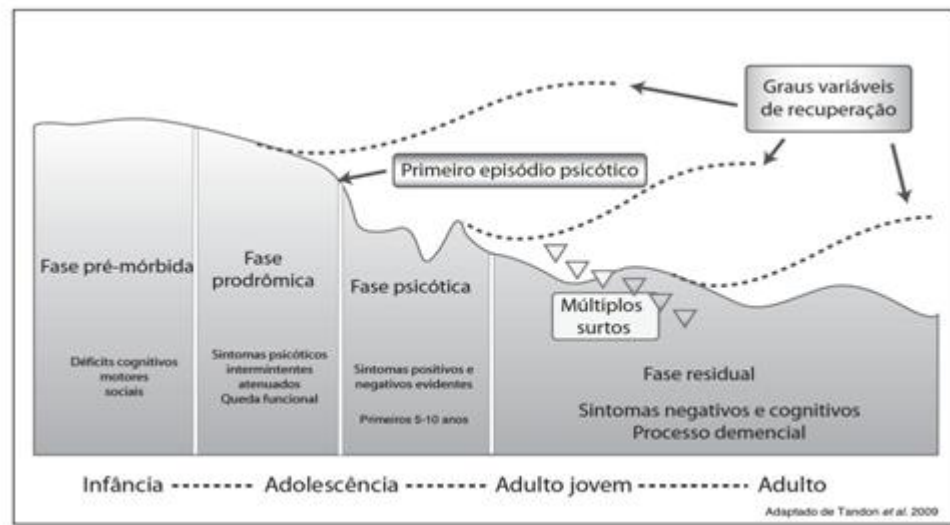


Figura 1. Curso da esquizofrenia considerando suas fases e sinais e sintomas.  
 Fonte: MASSUDA *et. al.*, 2013.

A lista de alterações psicopatológicas associadas à esquizofrenia é muito extensa, por isso sinais e sintomas isolados não são patognomônicos da doença (NARDI, 2014).

### 1.3. Diagnóstico

Os critérios para o diagnóstico da esquizofrenia estão descritos no *Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais* (DSM-5), e três destes critérios devem ser atendidos. A sintomatologia deve compreender no mínimo dois sintomas ativos entre delírios, alucinações, discurso desorganizado, comportamento amplamente desorganizado ou catatônico e sintomas negativos, pelo período de um mês. É obrigatório que haja uma disfunção social / ocupacional abaixo do nível alcançado antes do início dos sintomas, isso reflete na incapacidade de atingir realização interpessoal, acadêmica e profissional. E os sinais contínuos da perturbação devem persistir por, pelo menos, seis meses, incluindo um mês de sintomas positivos e também o período prodrômico e residual (APA, 2013).

O diagnóstico é eminentemente clínico, considerando a duração dos sintomas, a capacidade funcional da paciente, histórico de desenvolvimento, histórico familiar e genético. Exames laboratoriais não confirmam a doença, mas são importantes para o diagnóstico diferencial, descartando outras doenças, visto que uma ampla variedade de outras doenças produzem sintomas similares à esquizofrenia, tais como transtorno de humor com

características psicóticas, transtorno esquizoafetivo, transtorno depressivo, além de transtorno psicótico induzido por substâncias, em decorrência do uso de drogas de abuso, medicação ou exposição a uma toxina. No entanto, muitos estudos neuropsicológicos, neurofisiológicos e de neuroimagem têm demonstrado diferenças significativas entre paciente com esquizofrenia e controles, considerando uma variedade de medições que incluem avaliação de proteínas, citocinas, neurotrofinas entre outros (APA, 2013).

#### **1.4. Neurobiologia da esquizofrenia**

A etiologia da esquizofrenia ainda continua incerta, mas muito já se conhece sobre a fisiopatologia da doença. Essas descobertas se deram a partir dos efeitos antipsicóticos, na segunda metade do século XX, servindo como base para a teoria dopaminérgica. A hipótese de hiperfunção dopaminérgica (Figura 2) surgiu devido à capacidade dos antipsicóticos antagonizarem os receptores D2 e diminuírem os sintomas psicóticos nos pacientes (NARDI, 2014) e também por induzir quadros psicóticos com uso de anfetamina, agente caracterizado por induzir liberação de dopamina (BRESSAN, 2003). Com isso, muitos autores sugerem que o excesso de dopamina pré-sináptico no estriado está ligado ao aparecimento de sintomas psicóticos agudos e à resposta destes sintomas ao tratamento da esquizofrenia (MIYAKE, 2010). Porém, estes fármacos têm atividade limitada em relação aos sintomas negativos e ao prejuízo cognitivo (NARDI, 2014). Outra limitação da teoria dopaminérgica é de que 20-35% dos pacientes apresentam uma resposta parcial ou nenhuma resposta ao tratamento antipsicótico (PLITMAN, 2014). Por isso muitos estudos passaram a investigar alterações nas funções glutamatérgicas, serotoninérgicas, colinérgicas e GABAérgicas, em busca da participação de outros neurotransmissores na neurobiologia da esquizofrenia (CARLSSON, 1999; ABI-DARGHAM, 2005).

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central, estando relacionado com mecanismos de neurodegeneração e com a gênese da psicose. Ele se distribui amplamente nas estruturas do SNC e está envolvido em funções cognitivas fundamentais, tais como memória e aprendizado (NARDI, 2014).

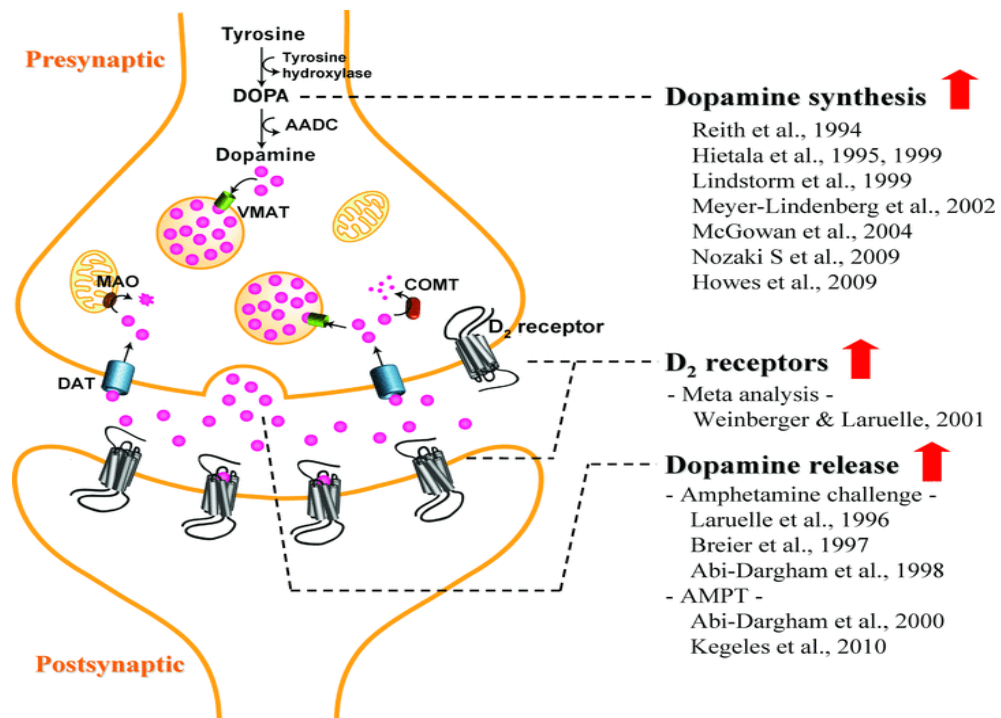


Figura 2. Hipóteses dopaminérgicas da esquizofrenia.  
Fonte: MIYAKE *et al.*, 2011.

Muitos estudos têm sugerido que os receptores glutamatérgicos tipo *N-metil-D-aspartato* (NMDA) estão envolvidos na fisiopatologia da esquizofrenia e podendo se tornar alvo para tratamentos psicofarmacológicos, como demonstrado na Figura 3. Os receptores NMDA (rNMDA) são essenciais para a plasticidade neuronal, incluindo sinaptogênese e excitotoxicidade. Estes receptores controlam o transporte de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e em especial do  $\text{Ca}^{2+}$  através da membrana neuronal, sendo a sua atividade regulada por uma série de fatores que acabam por determinar a abertura do canal iônico e a entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  (BRESSAN, 2003). Antagonistas do glutamato, tais como os fármacos fenciclidina (PCP) e cetamina, induzem sintomas da esquizofrenia - sinais psicóticos, sintomas negativos e déficits cognitivos - por meio da modulação do rNMDA. Ambos atuam como antagonistas não competitivos que exercem os seus efeitos fisiológicos através da inibição da ação do glutamato no receptor NMDA (PLITMAN, 2014).

A maioria das hipóteses glutamatérgicas destaca o papel central do glutamato associado à hipofunção dos receptores NMDA. Porém, Mehta e colaboradores (2013) sugere que o potencial do glutamato em induzir disfunção neuronal e degeneração, quando em concentrações extracelulares muito altas, processo conhecido como excitotoxicidade,

contribui para a esquizofrenia. Na presença de uma estimulação excessiva pelo glutamato há um aumento considerável do cálcio intracelular, afetando mecanismos homeostáticos deste íon e desencadeando uma cascata de eventos que acabam por resultar na morte celular (PLITMAN, 2014). Ainda, a hiperatividade dos neurônios glutamatérgicos em diferentes regiões cerebrais, incluindo córtex pré-frontal, estaria relacionada aos sintomas positivos, cognitivos e manifestações emocionais do transtorno (PAZ, 2008).

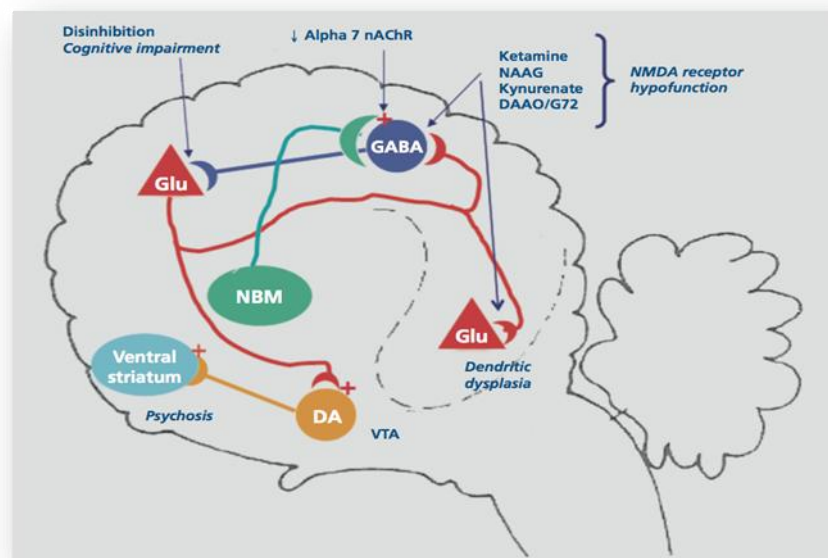


Figura 3. Representação dos circuitos sinápticos envolvidos na esquizofrenia e a hipofunção do receptor NMDA produzida por antagonistas exógenos.

Fonte: COYLE, 2010.

As vias neuronais do modelo dopaminérgico da esquizofrenia estão integradas com as vias do modelo glutamatérgico, pois ambos os sistemas têm uma grande interação no SNC, sendo necessário manter um equilíbrio regular entre dopamina e glutamato (PEETERS, 2002). Bradford (2009) descreve que o aumento da atividade dopaminérgica pode inibir a função glutamatérgica, resultando na hipótese hipoglutamatérgica da esquizofrenia.

### **1.5. Biomarcadores na esquizofrenia**

Atualmente resultados de marcadores biológicos nas áreas de neurofisiologia, neuroendocrinologia, psiconeuroimunologia, genética, ou psicofarmacologia tornaram-se potencialmente importantes para elucidar a patofisiologia da esquizofrenia (MÜLLER, 2008).

Há um crescente número de dados que mostram modificações do sistema imune em pacientes com essa doença. Vários estudos têm demonstrado níveis elevados de citocinas e outros sinais de ativação do sistema imunitário em indivíduos com psicose, onde um desequilíbrio na produção de citocinas pró e anti- inflamatórias geralmente é descrito, com um desvio para o quadro pró-inflamatório (BERGINK, 2014). Além disso foi demonstrada a relação existente entre quadros infecciosos no período gestacional e o desenvolvimento da esquizofrenia, visto que essa síndrome é de origem neurodesenvolvimental (AGUIAR, 2010), sendo o aumento dos níveis de interleucina 8 (IL-8) de mães durante a segunda trimestre de gravidez associadas com um risco aumentado para a esquizofrenia nos filhos (MÜLLER, 2008). Desregulação do sistema imunológico também pode afetar a função do receptor NMDA. Em estudo conduzido por Dalmau e colaboradores (2011), pacientes com encefalite anti-receptor N-metil-D-aspartato desenvolveram psicose. Além disso, processos inflamatórios levarem a um aumento da produção de ácido quinurenico, um antagonista endógeno do receptor NMDA (STEULLET, 2014). A expressão das quimiocinas, subgrupo de citocinas, está sendo avaliada nas doenças neuro-inflamatórias, tendo em vista a sua capacidade de controlar a infiltração de leucócitos no sistema nervoso central durante a inflamação. Alguns estudos descrevem como aumentadas as concentrações séricas de CCL11 (eotaxina-1) (TEIXEIRA, 2008; PEDRINI, 2014) e CCL24 (eotaxina-2) em pacientes com esquizofrenia em comparação com controles (PEDRINI, 2014).

O estresse oxidativo é um estado no qual ocorre um desequilíbrio entre processos antioxidantes e pró-oxidantes, que desencadeiam a produção de espécies reativas de oxigênio e radicais livres. Os radicais livres são moléculas instáveis com potencial para causar danos aos lipídeos da membrana celular, através da peroxidação (AGUIAR, 2010), e também aumentam o metabolismo oxidativo de catecolaminas, os quais podem desempenhar um papel importante na fisiopatologia da esquizofrenia (DADHEECH, 2008). O acúmulo de macromoléculas danificadas, tais como conteúdo de proteínas carboniladas (PCC) e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), devido ao aumento do estresse oxidativo e insuficiência de sistemas de reparo, é muito discutido na fisiopatologia das doenças neurodegenerativas (GAMA, 2006; GAMA, 2008a; GAMA, 2008b; KUNZ, 2008).

E também podem estar relacionados com o envelhecimento acelerado em pacientes com esquizofrenia (OKUSAGA, 2013).

Segundo Steullet e colaboradores (2014), várias proteínas relacionadas com a neurotransmissão glutamatérgica possuem sítios modulados por reações redox, incluindo glutamina sintetase e receptores NMDA. Enquanto estado redox modula a função do receptor, ativação sináptica deste reforça os mecanismos de defesa antioxidantes neuronais. A glutatona (GSH), principal agente antioxidante endógeno, constitui um reservatório neuronal de glutamato, frequentemente encontra-se depletada na esquizofrenia (STEULLET, 2014; DADHEECH, 2008; NG, 2008), indicando que os sistemas redox e glutamatérgicos estão relacionados. Um ensaio clínico utilizando N-acetilcisteína (NAC), um antioxidante que aumenta a produção de glutatona, como adjuvante na terapia da esquizofrenia, mostraram que este fármaco reduziu significativamente a gravidade dos sintomas (BERK, 2008).

Associado a inflamação, o estresse oxidativo pode também ser elevado na esquizofrenia. Juntos, inflamação e estresse oxidativo podem induzir reciprocamente um ao outro através de um ciclo de *feedback* positivo, em um circuito que envolve a indução do aumento da produção de radicais livres por citocinas pró-inflamatórias interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) e fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) na microglia. Além disso, os radicais livres aumentam a inflamação através da ativação quinases ativadas por estresse, como ERK, JNK e p38, por exemplo. O estresse oxidativo, em seguida, vai causar danos às macromoléculas celulares, tais como proteínas, lipídeos e DNA (OKUSAGA, 2013), conforme Figura 4.

O fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) é a neurotrofina mais amplamente distribuído no cérebro, expresso principalmente no córtex pré-frontal (CPF) e hipocampo, e tem sido associada a vários distúrbios psiquiátricos. Sua importância no SNC está relacionada com o neurodesenvolvimento, a formação das redes neurais, regulação das sinapses e a plasticidade neural (FAVALLI, 2012). Com base nisso, o BDNF tornou-se um bom candidato para explicar parte da patogênese da esquizofrenia, caracterizada por desordem do desenvolvimento encefálico e da plasticidade (GAMA, 2007; NIETO, 2013). Uma série de transtornos psiquiátricos tem sido associado à interrupção da sinalização do BDNF no cérebro, principalmente devido à diminuição na expressão ou liberação do mesmo (MITCHELMORE, 2014). É descrito uma redução na expressão do RNAm de *BDNF* e da proteína BDNF madura no córtex pré-frontal e hipocampo de pacientes com esquizofrenia (HASHIMOTO, 2005). BDNF também é conhecido por controlar a expressão do receptor de dopamina D3, o que levanta a hipótese de uma ligação entre a neurotransmissão

dopaminérgica e a área cortical, via BDNF, na esquizofrenia e no seu tratamento (NIETO, 2013).

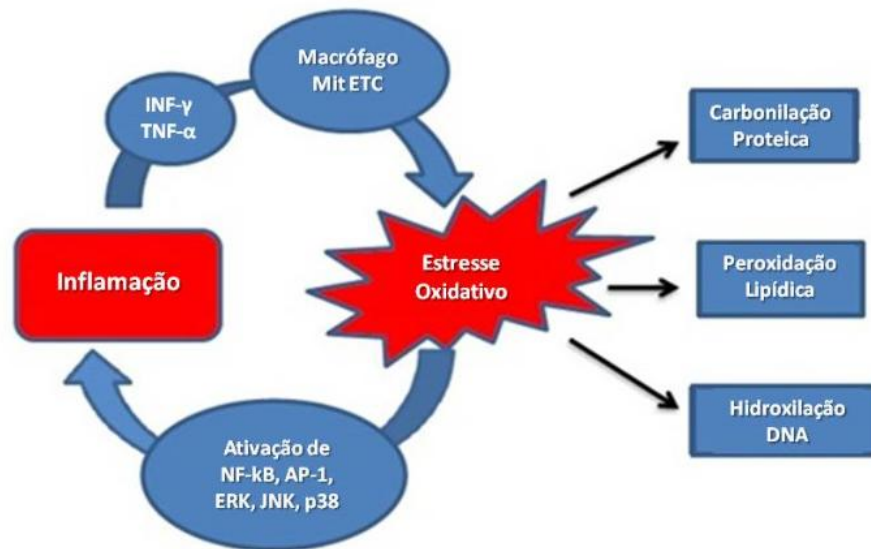


Figura 4. Inflamação e estresse oxidativo podem induzir reciprocamente um ao outro através de *feedback* negativo  
Fonte: Adaptado de OKUSAGA, 2013.

O sistema colinérgico controla diversas funções críticas, como o sono, cognição, controle motor e processamento sensorial. Todas as funções deste sistema são controladas pela interação da acetilcolina com dois tipos de receptores; os receptores nicotínicos e muscarínicos (SCARR, 2013). Os receptores colinérgicos nicotínicos (RCN) medeiam uma transmissão excitatória rápida e são amplamente expressos no SNC. Atuam regulando a liberação e a ativação de neurotransmissores nas regiões pré- e pós-sinápticas (VENTURA, 2009). Löscher e colaboradores (2009) relataram que o uso simultâneo de antagonistas nicotínicos e de receptores NMDA atenuam ataques epilépticos induzidos em ratos e camundongos. Recentemente, tem sido demonstrado que inibidores da acetilcolinesterase podem ser usados no tratamento de alucinações visuais, entretanto, alguns estudos evidenciam que colinesterases não oferecem qualquer melhoria significativa nos sintomas de esquizofrenia, sugerindo que os problemas no sistema colinérgico presentes na doença não são simplesmente devido a alterações nos níveis de acetilcolina (HIGLEY, 2014).



## 1.6. Tratamento

O tratamento da esquizofrenia baseia-se no uso precoce e continuado da medicação antipsicótica, levando em conta as fases da doença, que compreendem fase aguda, de estabilização e de manutenção. A fase aguda é caracterizada pelo momento da crise e nela objetiva-se a remissão total dos sintomas ou o mínimo de sintomas residuais, minimizando a sintomatologia da psicose. Após a remissão do surto inicia-se a fase estabilização, na qual se deve aprimorar o tratamento iniciado. Na fase de manutenção se mantém o esquema terapêutico ou ocorre a redução gradual deste, objetivando a dose mínima necessária para o controle dos sintomas (NARDI, 2014). Os antipsicóticos podem ser divididos, basicamente, em dois grupos: os clássicos ou típicos e o atípicos, conforme mostra figura 5.

O primeiro “neuroléptico” farmacologicamente efetivo para o tratamento da esquizofrenia introduzido no mercado foi clorpromazina, em 1952 (SCHULTZ, 2007; RANG, 2007). Este fármaco apresentava a capacidade de controlar os sintomas psicóticos sem sedar excessivamente os pacientes. A clorpromazina pertence à classe da fenotiazidas, desenvolvidas a partir do anti-histamínico H1, prometazina, e apresentam afinidade por vários receptores exercendo ações antagonistas correspondentes. Sendo o bloqueio do receptor da dopamina mais importante para o efeito antipsicótico, principalmente o bloqueio do receptor tipo D2, importante na gênese dos sintomas positivos. Além de bloquear diferentes mediadores, tais como histamina, catecolaminas, acetilcolina e 5-HT o que contribui para os efeitos adversos apresentados por estes antipsicóticos de primeira geração (APG), também chamados de típicos ou clássicos (RANG, 2007; LÜLLMANN, 2008).

Os APGs podem ser classificados como: a) alta potência: associados aos sintomas extrapiramidais (SEPs - distonias agudas e discinesias tardias), efeitos anticolinérgicos e adrenérgicos, porém conferem menor sedação, são exemplos de fármacos com essas características o Haloperidol e a Flufenazina; b) baixa potência, com menores riscos de SEPs, contudo apresentam maiores possibilidades de sedação, hipotensão, taquicardia, além de efeitos anticolinérgicos e adrenérgicos, são exemplos a Clorpromazina e a Levomepromazina (NARDI, 2014).

Os antipsicóticos de segunda geração (ASGs) ou atípicos diferem dos clássicos em suas estrutura e nas propriedades farmacológicas. Estes se caracterizam pelo antagonismo dos receptores D2 e da serotonina (5-HT<sub>2</sub>), são ditos atípicos por não apresentarem SEPs e por ter ação nos sintomas negativos, visto que os sintomas negativos, comprometimento

cognitivo e afetivo, ocorrem pela hipofunção dopaminérgica mesolímbica e pelo excesso de 5-HT (LÜLLMANN, 2008).

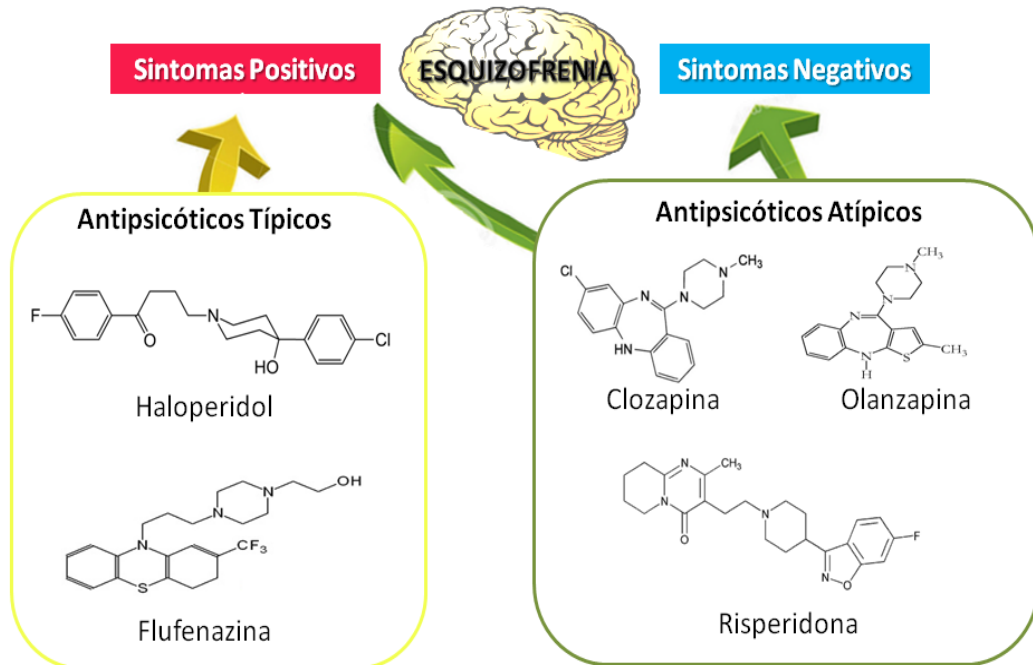


Figura 5. Ação dos antipsicóticos convencionais e atípicos.  
Fonte: Adaptado de LÜLLMANN, 2008.

Entre os ASGs disponíveis estão: Clozapina, Risperidona, Olanzapina, Quetiapina, Ziprazidona, Paliperidona, Amilsuprida e Aripiraprazol (MASSUDA *et al.*, 2013; RANG, 2007). A Clozapina, primeiro ASG descoberto, apesar de poder causar agranulocitose, é classicamente conhecida por mostrar efeito em pacientes refratários, além de ser o fármaco de escolha quando outros antipsicóticos necessitam ser interrompidos frente a reações motoras extrapiramidais (LÜLLMANN, 2008). A Olanzapina é estruturalmente semelhante à Clozapina, porém apresenta menor risco de agranulocitose e tem eficácia questionável em pacientes resistentes ao tratamento (RANG, 2007).

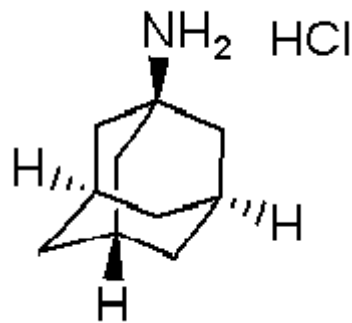
Os fármacos utilizados atualmente apresentam uma boa resposta para os sintomas positivos da doença, mas associações são indicadas. Para melhorar os sintomas negativos, muitos tratamentos têm incorporado a terapia adjuvante, incluindo antipsicóticos, antiinflamatórios, antidepressivos e N-acetil-cisteína (HALLER, 2014). Como exemplo, em um estudo conduzido por Lucena e colaboradores (2009) foi possível demonstrar o papel positivo da terapia adjuvante da Memantina, indicada para o tratamento de pacientes com doença de Alzheimer moderada a grave, no tratamento da esquizofrenia. Houve uma melhora dos sintomas positivos sem agravamento da psicose no grupo de tratamento ativo, isso se

deve à propriedade antagonista não competitivo dos receptores NMDA do fármaco, que atua prevenindo danos excitotóxicos retardando assim a progressão dos sintomas.

### 1.7. Amantadina

A Amantadina consiste de um esqueleto de adamantano que tem um grupo amino substituído em uma das quatro posições metino, compondo uma amina primária tricíclica hidrossolúvel, de fórmula molecular  $C_{10}H_{17}N$  (PARKES, 1970), sua molécula está representada na figura 6.

Figura 6. Molécula da amantadina.



Cloridrato de amantadina (cloridrato de tricyclodecano-1-amina) foi descoberta por químicos da Dupont em 1964, descrito como o primeiro fármaco a ter efeito contra o vírus *Influenza A* (BATISTA, 2011). Apesar de ter sido aprovada pelo *Food and Drug Administration* (FDA) em 1976 como um medicamento antiviral, não é mais recomendado para esta finalidade. A ação antiparkinsoniana foi descrita em um estudo duplo-cego controlado em pacientes com diagnóstico de Parkinson, onde foi possível demonstrar um espectro de atividade da amantadina similar ao levodopa (PARKES, 1970). Tratamento de curto prazo da catonia com amantadina, em pacientes esquizofrênicos, mostrou-se eficaz no tratamento dos sintomas negativos e cognitivos da doença (ASEVEDO, 2013).

As propriedades físico-químicas e farmacocinéticas da amantadina estão descritas na Tabela 2. A amantadina é rapidamente absorvida no trato gastrointestinal, apresentando um volume de distribuição muito grande. É excretada em grande parte na forma não metabolizada, na urina por filtração glomerular e provavelmente secreção tubular (GOODMAN & GILMAN, 2012; AOKI, 1988).

Tabela 2. Características farmacocinéticas da amantadina.

Fórmula molecular	C <sub>10</sub> H <sub>17</sub> N · HCl	
Peso molecular	187,71	
Solubilidade	50 mg/ml (H <sub>2</sub> O) em etanol e clorofórmio.	Solúvel
Biodisponibilidade oral e excreção urinária	50 a 90%	
Ligação a proteínas plasmáticas	67%	
Volume de distribuição	4,4 ± 0,2 l/kg (pacientes com função renal normal); 5,1 ± 0,2 l/kg (pacientes com doença renal)	
Tempo de Meia- vida	11 a 15 horas (pacientes com função renal normal - variação: 7 a 37 horas); 24 horas (pacientes com doença renal; 7 a 10 dias em pacientes com doença renal crônica)	
Tempo para concentrações máximas	1 – 4 horas	
Pico de concentração plasmática	Aproximadamente 0,3 µg/ml. No equilíbrio a concentração é de 0,2 a 0,9 µg/ml	
Concentrações máximas	Média de 0,5 a 0,8 µg/ml, posologia de 100mg administrados 2 x dia	

Fonte: GOODMAN & GILMAN, 2012; AOKI, 1988.

Apesar do mecanismo de ação exato da amantadina não ser totalmente esclarecido, vários estudos apontam para o papel modulador do sistema monoaminérgico, que leva ao aumento da liberação de dopamina, serotonina e noradrenalina no hipocampo e amígdala (LUCENA, 2012; EAGLE, 2014; HOSENBOCUS, 2013; PEETERS, 2002). Inicialmente, pensava-se que a amantadina aumenta a atividade da dopamina, facilitando a liberação de dopamina pré-sináptica e bloqueando a recaptação de dopamina pós-sináptica. Na verdade, a amantadina não age diretamente sobre os receptores de dopamina, e sim é um antagonista não competitivo dos receptores de glutamato tipo NMDA (EAGLE, 2014; HOSENBOCUS, 2013). Facilita a liberação de dopamina, bloqueia a recaptação de dopamina e inibe a ativação da microglia e neuroinflamação, desempenhando um papel neuroprotetor frente ao dano excitotóxico induzido pelo glutamato (EAGLE, 2014).

Amantadina e sua análoga estrutural, memantina, são bloqueadores dos canais de NMDA que apresentam grande utilidade clínica. Porém, Blanpied e colaboradores (2005) mostraram que a amantadina inibe as respostas de NMDA por meio da estabilização do estado fechado do canal, bem como através do bloqueio do canal, evidenciando a amantadina como primeiro bloqueador de canal receptor de NMDA orgânico, de baixa afinidade e efeito fisiológico muito semelhante ao  $Mg^{++}$ . Isso justifica sua boa aceitação clínica e perfil terapêutico distinto de outros bloqueadores, que tendem a piorar ou até mesmo induzir quadros psicóticos.

## 2. OBJETIVOS

Verificar se a amantadina, quando usada como terapia adjuvante aos antipsicóticos, interfere nos sintomas negativos e positivos de pacientes com diagnóstico de esquizofrenia.

### 1.8. Objetivos específicos:

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Verificar se pacientes com diagnóstico de esquizofrenia apresentam modificação dos sintomas negativos quando a amantadina é usada como terapia adjuvante aos antipsicóticos;
- Verificar se pacientes com diagnóstico de esquizofrenia apresentam modificação dos sintomas positivos quando a amantadina é usada como terapia adjuvante aos antipsicóticos;
- Verificar se pacientes com diagnóstico de esquizofrenia apresentam modificação dos sintomas de psicopatologia geral quando a amantadina é usada como terapia adjuvante aos antipsicóticos;
- Verificar se pacientes com diagnóstico de esquizofrenia apresentam modificação sérica dos níveis de BDNF, de quimiocinas (CCL11 e CCL24), de AchE e de marcadores de estresse oxidativo (TBARS, PCC, GPx, GR, GS-T) quando a amantadina é usada como terapia adjuvante aos antipsicóticos.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 1.9. Amostra

Foram selecionados para o estudo 20 pacientes com idade entre 18 e 45 anos, incluindo, de maneira consecutiva, indivíduos portadores do Diagnóstico de Esquizofrenia pelos critérios DSM-IV (APA, 1994). A escala PANSS (*Positive and Negative Scale for Schizophrenia*) foi aplicada, e somente os sujeitos que apresentaram pontuação maior ou igual a 20 na sessão para sintomas negativos foram incluídos. Os critérios de exclusão utilizados foram: história de epilepsia precedendo o diagnóstico de Esquizofrenia; história de tumor cerebral; presença de doença grave hepática, renal ou cardíaca; psicose alcoólica ou tóxica; história de dependência/abuso de substâncias psicoativas; situação potencial de gravidez e(ou) lactação; outros diagnósticos psiquiátricos (Check-list do DSM IV); ter sorologia positiva para o vírus HIV.

Os pacientes e os familiares foram informados do que consistia o estudo, seus riscos, características de funcionamento, e somente entraram no estudo após assinar termo de consentimento pós-informação. O recrutamento dos pacientes foi realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). O projeto sob o número 09-303 – CEP/HCPA foi aprovado pelo comitê de ética do HCPA.

#### 1.10. Condução do estudo

Delineamento do estudo: ensaio clínico randomizado controlado por placebo.

Os pacientes selecionados foram randomizados com base em uma tabela de números aleatórios para receber Amantadina ou placebo. A avaliação destes pacientes foi realizada ao longo de 12 semanas. Os antipsicóticos foram mantidos conforme tratamento prévio. Ao iniciar o estudo (T0) foi aplicada a Escala Breve de Avaliação Psiquiátrica (BPRS - *Brief Psychiatric Rating Scale*) (OVERALL & GORHAM, 1962) e o sangue venoso periférico foi coletado para análises bioquímicas. Após, o tratamento adjuvante com Amantadina ou placebo, em cápsulas de 100mg por dia, foi iniciado. As doses tiveram incremento de 100mg a cada três dias até atingir 400mg por dia. A partir da quarta semana os pacientes

administraram cápsulas de 200mg ou placebo duas vezes ao dia. A escala BPRS foi aplicada na segunda (T2), quarta (T4) e oitava (T8) semana de tratamento para avaliar a eficácia de tratamentos psiquiátricos. Na décima segunda semana (T12), realizou-se a última avaliação com BPRS, bem como coleta de sangue periférico.

### **1.11. Análises bioquímicas**

Cinco mL de sangue venoso periférico foi coletado de cada indivíduo no T0 e no T12 e foram imediatamente centrifugados a 4.000 g por 10 minutos. As alíquotas de soro foram mantidas congeladas a -80 °C até serem analisadas.

#### **3.3.1. Carbonilas proteicas**

Dano oxidativo a proteínas foi avaliado pela determinação de grupos carbonil (conteúdo de carbonilas proteicas, PCC) baseado na reação com dinitrophenilhidrazina (DNPH), de acordo com as instruções do fabricante (Cayman Chemical Company, USA). Foram feitos dois sets de amostras, branco e teste, tratados com ácido clorídrico (HCl) 2N e DNPH 10Mm, respectivamente. Após, foi realizada uma desproteíntização pela adição de ácido tricloroacético (TCA) a 20% e a 10%. O *pellet* de proteínas foi em seguida lavado com uma solução de acetato de etila e etanol (1:1). Por fim, foi acrescentado hidrocloreto de guanidina para ressuspender o *pellet*. A absorbância foi lida a 370nm.

#### **3.3.2. Proteínas**

O conteúdo proteico das amostras foi determinado pelo método de Lowry e colaboradores (1951), utilizando como padrão albumina bovina sérica.

#### **3.3.3. TBARS**

Os níveis de peroxidação lipídica foram avaliados através da formação do composto malondialdeído (MDA), como descrito anteriormente (Wills, 1966) e de acordo com as instruções do fabricante do Kit utilizado (Cayman Chemical Company, USA).



Resumidamente, as amostras foram tratadas com desnaturante dodecilsulfato de sódio (SDS) e, em seguida, incubadas por 1 hora, em banho seco a 100°C, na presença de reagente de cor contendo ácido tiobarbitúrico, formando composto corado na presença de MDA. As TBARS foram determinadas pela absorvância em espectrofotômetro a 535 nm.

#### **3.3.4. Quimiocinas: Eotaxina/CCL11 e Eotaxina-2/CCL24**

A determinação das quimiocinas no soro de pacientes e controles foi realizada por Kit ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) sanduíche de acordo com as instruções do fabricante (DuoSet, R & D Systems, Minneapolis, MN, USA). Resumidamente, placas de 96 poços foram sensibilizadas *overnight* com o anticorpo de captura específico (CCL11 ou CCL24) em PBS. Em seguida, as placas foram lavadas com tampão de lavagem (PBS, pH 7,4, com 0,05% de Tween 20) e bloqueadas *overnight* com reagente diluente (PBS com 1% de BSA). Após lavagem, foram adicionadas as amostras, diluídas 1:3, e mantidas à temperatura ambiente por 2 horas. As placas foram lavadas novamente e foi adicionado um anticorpo de detecção biotilado, incubado durante 2 horas à temperatura ambiente. Após a lavagem, foi realizada a incubação com o conjugado de estreptavidina-peroxidase (diluído 1: 200 em reagente diluente) durante 20 min à temperatura ambiente. Depois, as placas foram lavadas e incubadas com o substrato durante 20 minutos à temperatura ambiente. Finalmente, a solução de parada (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M) foi adicionada e a quantidade de quimiocinas foi determinada por absorvância a 450 nm.

#### **3.3.5. BDNF**

Os níveis séricos de BDNF foram determinados utilizando Kit ELISA sanduíche, de acordo com as instruções dos fabricantes, (Chemicon, Temecula, CA, USA). Resumidamente, BDNF da amostra se liga especificamente a um anticorpo policlonal de captura e, posteriormente, incubada com um segundo anticorpo monoclonal de detecção. A peroxidase de rábano e solução de tetrametilbenzidina foram adicionados para produzir uma reação.

#### **3.3.6. Acetilcolinesterase**

A acetilcolinesterase teve sua atividade determinada seguindo o aumento da cor amarela produzida a partir da reação entre tiocolina, produzida na hidrólise da acetilcolina, e dithiobisnitrobenzoate (DTNB), conforme descrito anteriormente (Ellman, 1961) e de acordo com as instruções do fabricante do Kit utilizado (Abcam, UK). Foi preparada uma mistura de reação contendo tampão, DTNB e acetilcolina a qual foi adicionada as amostras, diluídas 1:50 em triplicata, e o padrão. Após incubação de 30 minutos a absorbância foi lida em 410nm.

### **3.3.7. Glutathione Peroxidase (GPx)**

A atividade da enzima GPx foi determinada indiretamente através de um ensaio enzimático utilizando kit comercial (Cayman Chemical Company, USA), de acordo com o método de Wendel (1981) e segundo instruções do fabricante. Em uma placa de 96 poços, foram adicionadas as amostras, diluídas 1:2, e o co-substrato, composto por NADPH, glutathione e glutathione redutase. O ensaio foi realizado na presença de controles negativos e positivos. Para iniciar a reação foi adicionado hidroperóxido de cumeno e o consumo de NADPH foi monitorado em cinco tempos diferentes a 340nm. Uma unidade de GPx é definida como 1µmol de NADPH consumido por minuto e a atividade é representada por unidades de GPx/mg de proteína.

### **3.3.8. Glutathione Redutase (GR)**

A proteção frente ao estresse oxidativo, conferido pela GR, foi avaliada através da redução da glutathione na presença de NADPH, conforme descrito anteriormente (Calberg, 1985) e segundo instruções do fabricante do Kit (Cayman Chemical Company, USA). As amostras, diluídas 1:2, foram adicionadas de tampão e glutathione oxidada, sendo a reação iniciada pela adição de NADPH. Cinco tempos diferentes foram monitorados a 340nm, sendo a atividade da GR diretamente proporcional à oxidação do NADPH e a redução da absorbância.

### **3.3.9. Glutathione S-Transferase (GS-T)**

A atividade total da GS-T foi medida pela conjugação da glutathione reduzida com o CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno), conforme instruções do fabricante do Kit (Cayman

Chemical Company, USA). A atividade da GS-T é diretamente proporcional ao aumento da absorbância a 340nm, acompanhando o aumento do número de conjugações.

#### **3.4. Análise estatística**

A análise estatística foi realizada no software *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS), versão 20.0. Foi utilizado um modelo de regressão linear para medidas repetidas – *General Linear Model* – para verificar o efeito do tratamento nos sintomas entre os grupos. Para comparação das variáveis demográficas e medidas séricas entre os grupos, foi usado o teste T-Student para distribuição paramétrica e Mann-Whitney para distribuição não-paramétrica. Análises descritivas são apresentadas como média e desvio padrão. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

#### 4. RESULTADOS

Os resultados referentes às características sociodemográficas da amostra dos pacientes estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3. Características sociodemográficas.

<b>Característica</b>		<b>Média ± DP</b>
<b>Sexo (F/M)</b>	5/15	-
<b>Idade</b>	21/38 <sup>&amp;</sup>	27.80 ± 5.05
<b>Anos estudo</b>	3/13 <sup>&amp;</sup>	8.40 ± 3.13
<b>IMC</b>	19/42 <sup>&amp;</sup>	27.25 ± 6.04 <sup>#</sup>
<b>Tabagismo Atual (S/N)</b>	7/13	11.35 ± 19.56 <sup>^</sup>
<b>Etnia (Branco/Não branco)</b>	11/8 <sup>*</sup>	-
<b>Amantadina/Placebo</b>	9/11	-
<b>Idade diagnóstico</b>	14/35 <sup>&amp;</sup>	22.85 ± 6.02
<b>Idade primeiro episódio</b>	14/35 <sup>&amp;</sup>	22.30 ± 6.04
<b>Uso Clozapina (S/N)</b>	0/20	-
<b>Tempo de doença (&lt;10anos)</b>	20	-
<b>FAST</b>	-	38.55 ± 13.41

DP, desvio padrão; F, feminino; M, masculino; S, sim; N, não; FAST, Functioning Assessment Short Test; \* n=19; #n=18; & mínimo/máximo; ^ Cigarros por dia.

O tratamento com amantadina apresentou diferença significativa nos sintomas de psicopatologia geral da escala BPRS ( $p < 0,001$ ) e na sua subescala de sintomas negativos ( $p = 0,015$ ), mas o mesmo não se aplica para os sintomas positivos ( $p = 0,198$ ) (Tabela 4).

Tabela 4. Avaliação dos sintomas, segunda escala BPRS, nas doze semanas de tratamento.

	Média ± DP					Pillai's Trace	
	T0	T2	T4	T8	T12	F	P
<b>BPRSPos.</b>						1,719	0,198
Placebo	3,63 ± 4,31	7,27 ± 4,71	7,45 ± 5,12	7,09 ± 5,35	7,00 ± 4,75		
Amantadina	7,44 ± 4,53	7,78 ± 3,38	4,56 ± 2,96	6,00 ± 4,69	4,89 ± 3,33		
<b>BPRSNeg.</b>						4,358	0,015*
Placebo	9,27 ± 4,60	7,27 ± 4,71	7,45 ± 5,12	7,09 ± 5,35	7,00 ± 4,75		
Amantadina	8,00 ± 3,60	7,77 ± 3,38	4,55 ± 2,96	6,00 ± 4,69	4,88 ± 3,33		
<b>BPRSTot.</b>						22,632	0,000*
Placebo	21,54 ± 7,77	17,09 ± 9,66	18,00 ± 14,81	16,45 ± 12,87	16,54 ± 9,56		
Amantadina	27,33 ± 7,48	21,77 ± 8,65	12,00 ± 6,12	13,44 ± 5,96	12,00 ± 7,61		

DP, desvio padrão; Pillai's trace, teste multivariado; BPRS, Brief Psychiatric Rating Scale : BPRSPos., sintomas positivos; BPRSNeg., sintomas negativos; BPRSTot., sintomas de psicopatologia geral; T0, *baseline*; T2, duas semanas; T4, quatro semanas; T8, oito semanas; T12, doze semanas; \* $p < 0,05$ .

Essas diferenças podem ser observadas nas Figuras 6 e 7.

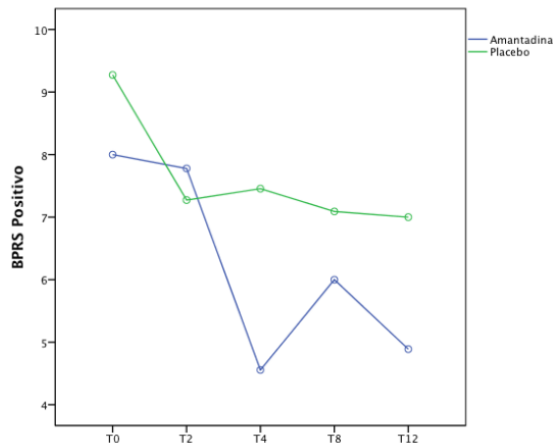


Figura 6. Gráfico da avaliação dos sintomas positivos durante as doze semanas de tratamento com amantadina ou placebo.

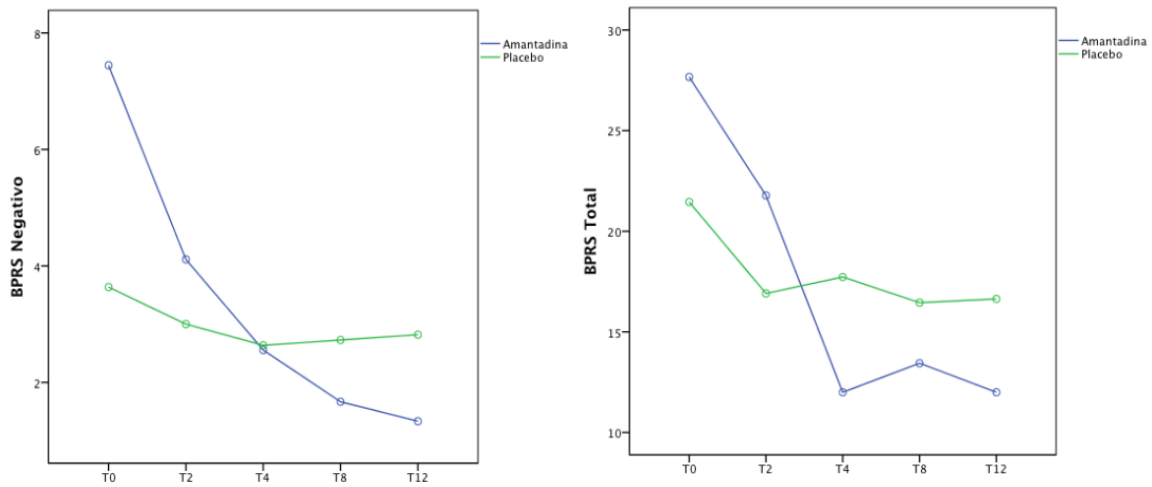


Figura 7. Gráfico da avaliação dos sintomas negativos e de psicopatologia geral durante as doze semanas de tratamento com amantadina ou placebo.

Os resultados dos níveis dos biomarcadores avaliados foram expressos em índice, ou seja, através da variação entre os resultados da última coleta (semana 12) e primeira coleta (*baseline*). A terapia com amantadina não alterou significativamente os parâmetros, exceto o índice de proteínas carboniladas (Tabela 5).

Tabela 5. Níveis dos biomarcadores séricos após o uso de amantadina.

Índice	Média ± DP	P
BDNF	2,773 ± 17,32	0,603
Proteínas Carboniladas	-0,016 ± 0,05	0,020*
TBARS	-10,777 ± 20,13	0,412
GPx	10,276 ± 210,26	0,295
GR	0,967 ± 6,01	0,412
GS-T	-1,723 ± 13,05	0,656
AchE	3,401 ± 8,02	0,824
CCL11	-8472,35 ± 32101,39	0,370
CCL24	38966,45 ± 140165,24	0,552

Índice, variação T12 – T0; BDNF, fator neurotrófico derivado do encéfalo; GPx, glutathione peroxidase; GR, glutathione reductase; GS-T, glutathione s-transferase; AchE, acetilcolinesterase; CCL11/CCL24, quimiocinas; DP, desvio padrão; \* $p < 0,05$ .

A Figura 8 demonstra o aumento do estresse oxidativo apresentado pelos pacientes tratados com amantadina em relação ao grupo controle.

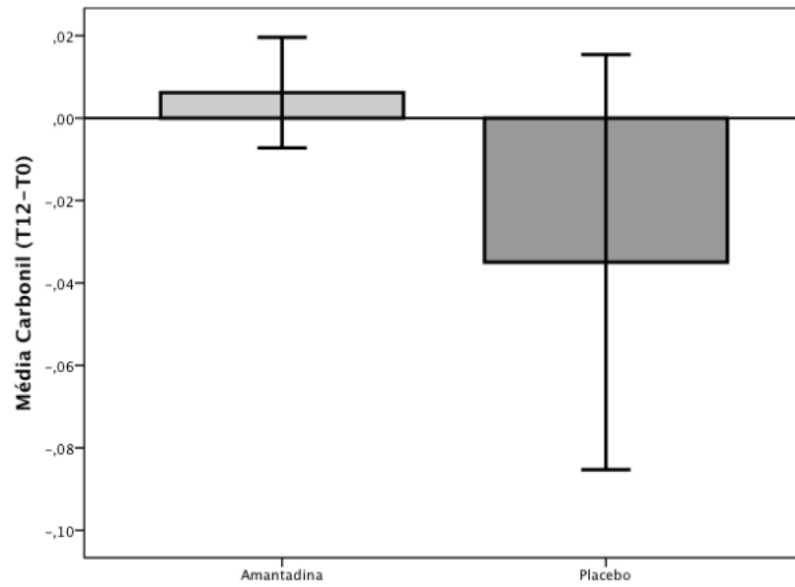


Figura 8. Índice de proteínas carbonilas no grupo tratado com amantadina e no grupo controle;  $p < 0,05$ ; Teste t não paramétrico : Mann-Whitney.

## 5. DISCUSSÃO

Amantadina foi utilizada inicialmente como antiviral, mas devido a seu menor efeito psicomimético, ganhou destaque no tratamento da doença de Parkinson. Seu mecanismo ação ainda não está bem descrito na literatura. Sabe-se que amantadina age como antagonista não competitivo dos receptores NMDA de glutamato, tendo por característica sua baixa afinidade pelo receptor e sua rápida cinética de bloqueio e desbloqueio. E também age promovendo a síntese e liberação de dopamina e diminuindo a recaptção de dopamina na fenda pré-sináptica (KORNHUBER, 1994; BLANPIED, 2005; PEETERS, 2002).

Neste estudo observou-se que a amantadina, utilizada como adjuvante na terapia com antipsicóticos, exceto clozapina, foi capaz de diminuir os sintomas negativos e de psicopatologia geral da esquizofrenia, em relação ao grupo placebo, de acordo com a escala BPRS. Não houve aumento dos sintomas positivos medidos pela BPRS, apesar do papel de modulador dopaminérgico deste fármaco. A melhora dos demais sintomas evidencia o envolvimento dos receptores glutamatérgicos tipo NMDA na fisiopatologia da doença.

A eficiência para tratar sintomas negativos e cognitivos na esquizofrenia corrobora estudos anteriores que também apresentam esses resultados com uso de aminoadamantanos - amantadina e memantadina (GAMA, 2010; CARPENTER, 2006). Estando de acordo com a hipótese de que a homeostase do sistema dopaminérgico e glutamatérgico, em algumas áreas do cérebro, mediada pela ativação dos receptores NMDA, seria de alguma forma responsável pela melhora destes sintomas (LUCENA, 2012).

Amantadina atua nos receptores de NMDA acelerando o fechamento do canal, apesar de apresentar uma rápida cinética de desligamento, ao contrário de outros antagonistas, como a fenciclidina e cetamina, que mantêm o canal aberto (BLANPIED, 2005). A manutenção do canal aberto aumenta o influxo de cálcio, aumentando a neurotransmissão, levando a sintomas psicóticos (STAHL, 2013; BRESSAN, 2003) e também a excitotoxicidade, culminando na morte neuronal (RUGGIERO, 2011). A afinidade do antagonista pelos rNMDA também tem grande relação com seus efeitos. Bloqueadores de alta afinidade apresentam efeitos psicomiméticos, semelhantes à esquizofrenia, incluindo alucinação, paranoia, emoção retraída e retardo motor. Assim, propõe-se que o uso de antagonistas de NMDA de baixa afinidade



pode ter melhor efeito terapêutico e com menores efeitos adversos do que aqueles de alta afinidade (GETER-DOUGLASS, 1994).

O efeito da amantadina sobre os neurônios dopaminérgicos em cérebro de ratos foi investigado por Toide (1990), onde ele foi capaz de mostrar diferentes efeitos do fármaco em relação à concentração de dopamina (DA), ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) e ácido homovanílico (HVA) em diferentes regiões do cérebro. Na concentração de 40 mg/kg, amantadina aumentou os níveis de dopamina em 16%, de DOPAC em 24 % e de HVA em 44% no córtex frontal. Estas mudanças foram diferentes quando comparadas a outras regiões, tais como corpo estriado e núcleo caudado. Juntos, estudos pré-clínicos e clínicos, sugerem o papel da amantadina na mediação dos sintomas negativos e cognitivos da esquizofrenia, visto que há um aumento da concentração de dopamina na via mesocortical, característica da hipofuncionalidade na doença.

Ensaio aberto, realizados por diferentes pesquisadores também mostraram dos sintomas da esquizofrenia. Por exemplo, Mcevoy e colaboradores (1987) mostraram que após tratamento de seis semanas, os pacientes que utilizaram amantadina tiveram uma melhora nos testes de aquisição de memória, em comparação com aqueles tratados com anticolinérgico, evidenciando diminuição dos efeitos colaterais extrapiramidais ocasionados por antipsicóticos. Gama e colaboradores (2010), com base em uma série de casos, demonstraram a melhora dos sintomas negativos e positivos da esquizofrenia em pacientes utilizando amantadina como coadjuvante aos antipsicóticos.

Lucena e colaboradores (2009) mostraram que a memantina, usada como adjuvante à terapia com clozapina foi capaz de melhorar tanto os sintomas positivos como os negativos, em pacientes refratários. Como já mencionado, memantina é um antagonista não competitivo dos receptores NMDA, contudo vários estudos também vêm sugerindo a interação da clozapina com os rNMDA (SCHWIELER, 2004; TSAI, 1999; SCHWIELER, 2008). Gray e colaboradores (2009), em estudo com animais, demonstram que o tratamento crônico com clozapina era acompanhado não só por uma *up-regulation* dos receptores de NMDA, na região hipocampal e cortical. A clozapina pode exercer função de agonista parcial ou antagonista no sítio de ligação da glicina nos receptores NMDA. Quando o sítio glicina/rNMDA está saturado por ligantes endógenos (glicina ou D-serina), há uma ação antagonista da clozapina, o que está associada com a ativação de neurônios dopaminérgicos. Já ação agonista no sítio glicina/rNMDA é proeminente no cérebro hipoglutamatérgico, o que leva a inibição dos neurônios dopaminérgicos da área tegumental ventral (Schwieler, 2008),

ou seja, a clozapina reduz os sintomas negativos através do aumento da função dos rNMDA. Com isso, é possível sugerir que a memantina teve bons resultados nos sintomas da esquizofrenia baseado na ação da clozapina nos rNMDA. Enquanto, a amantadina teve o mesmo efeito sobre os sintomas negativos, em pacientes tratados com antipsicóticos em geral, exceto clozapina, o que pode ter uma colaboração do seu efeito dopaminérgico.

O presente estudo avaliou parâmetros bioquímicos, tais como neurotrofinas, estresse oxidativo e marcadores imunológicos, para complementação dos dados clínicos, visto que na literatura a investigação destes biomarcadores é amplamente empregada na elucidação da fisiopatologia da esquizofrenia (PEDRINI, 2011). São também utilizados para acompanhamento da resposta farmacológica (TRAMONTINA, 2009). Porém, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas, entre o *baseline* e o fim do estudo, exceto na dosagem de proteínas carboniladas, indicador de estresse oxidativo.

Muitos estudos sugerem que o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) pode estar relacionado com as anormalidades do desenvolvimento neurológico encontrados na esquizofrenia. São significativamente reduzidos os níveis de BDNF no soro de pacientes com esquizofrenia, porém estão correlacionados positivamente com níveis clozapina (QIAN, 2007). O uso do derivado aminoadamantado, memantina, mostrou-se capaz de aumentar o BDNF, devido a um efeito em células não neuronais conhecidos por produzir BDNF, ativando os receptores NMDA extra sinápticos e promovendo a função neuronal (MEISNER, 2008). Apesar de Ohlmeier e colaboradores (2008) demonstrarem que a amantadina era capaz de contribuir para o aumento do BDNF e estabilizar a membrana neuronal em pacientes bipolares infectados pelo vírus da doença de Borna, porém nossos resultados não corroboram esse achados.

Muitos estudos avaliam a associação do tratamento com antipsicóticos e os níveis séricos de BDNF, contudo os resultados são contraditórios (RIZOS, 2014). Gama e colaboradores (2007) demonstraram que os níveis de BDNF estavam elevados em pacientes tratados com antipsicóticos (típicos e atípicos) em comparação com os controles saudáveis. Em contrapartida, alguns estudos relatam que o tratamento com haloperidol e risperidona pode diminuir os níveis desta neurotrofina (PILLAI, 2008) ou até mesmo não mostrar diferenças significativas após quatro semanas de tratamento com risperidona (YOSHIMURA, 2007). Com isso não se pode descrever de que forma os antipsicóticos afetam os níveis de BDNF. Contudo, devemos considerar o papel de outros fatores, tais como fase da doença,

sexo e características genéticas, que parecem desempenhar um importante papel nos níveis de BDNF.

Alterações imunológicas são associadas à esquizofrenia, sendo a investigação de citocinas, no soro e plasma dos pacientes, amplamente descrita na literatura, focando principalmente nas citocinas pró-inflamatórias (MÜLLER, 2006; KUNZ, 2011; ASEVEDO, 2013; PEDRINI, 2014; STUART, 2014). No entanto, poucos estudos tem avaliado longitudinalmente a relação destas quimiocinas com a esquizofrenia. O que é muito importante para esclarecer o papel da quimiocinas, tendo como base as ligações mecânicas entre esquizofrenia e períodos neurológico de desenvolvimento (Stuart, 2014). De acordo com revisão apresentada por Stuart & Baune (2014), as quimiocinas CCL2, CCL3 e CCL5 apresentam-se aumentadas em pacientes esquizofrênicos em comparação com os controles. CCL11 também é descrita por estar aumentadas no soro de pacientes com esquizofrenia em comparação com os controles ( $p < 0,01$ ). Da mesma forma que CCL11, CCL24 é também um ativador eficaz do receptor de quimiocina CCR3, que é expresso em eosinófilos e outros tipos de células, incluindo os mastócitos e linfócitos que segregam IL-4 e IL-5. Porém, CCL24 não foi alterada em doentes com esquizofrenia (TEIXEIRA, 2008). Em contrapartida, Pedrini e colaboradores (2014) descreveram níveis elevados de CCL11 e CCL24 em pacientes crônicos quando comparados ao grupo controle. Os nossos resultados corroboram os dados de CCL24 apresentados por Teixeira e colaboradores (2008), mas não os descritos para CCL11 (TEIXEIRA, 2008; PEDRINI, 2014). Contudo, não fica claro se as quimiocinas funcionam como biomarcadores úteis para a esquizofrenia. Para isso seriam necessários mais estudos envolvendo modelo animal de esquizofrenia incluindo ensaios de quimiocinas, com intuito de esclarecer a real relevância desses marcadores e seus receptores na doença.

Existem muitas evidências de que o estresse oxidativo pode desempenhar um papel importante na fisiopatologia de doenças neurodegenerativas, tais como a esquizofrenia (DADHEECH, 2006; GAMA, 2008; NG, 2008; DIETRICH-MUSZALSKA, 2010; GAMA, 2006). Quando a defesa antioxidante está prejudicada pode haver um aumento da peroxidação lipídica. Um dos mais importantes antioxidantes endógenos é glutathione, que desempenha um papel importante no metabolismo, transporte, detoxificação de espécies reativas de oxigênio e proteção celular. Níveis significativamente mais baixos de GSH, GPx e GR são encontrados no grupo esquizofrênico que no grupo controle sem transtornos psiquiátricos (YAO, 2006). Há uma redução de 27% nos níveis de GSH no líquido cefalorraquidiano de pacientes não tratados e uma redução semelhante (41%) no caudado de pacientes esquizofrênicos pós-morte

(RAFFA, 2011). Outra forma de avaliar o estresse oxidativo é através da investigação do malondialdeído (MDA), produto final da peroxidação lipídica. O MDA é avaliado através das substâncias tiobarbitúricas reativas (TBARS) (DIETRICH-MUSZALSKA, 2010). Muitos estudos descrevem os níveis de TBARS elevado tanto em pacientes esquizofrênicos tratados como nos pacientes não tratados (DIETRICH-MUSZALSKA, 2010; GAMA, 2006; GAMA, 2008), bem como, em irmãos de pacientes esquizofrênicos (MASSUDA, 2013). Por outro lado, alguns estudos descrevem não encontrar uma diferença significativa entre os níveis de TBARS nos pacientes em comparação com os controles saudáveis (HUANG, 2010; RANJEKAR, 2003). Sendo descrito também que o tratamento com antipsicóticos, tanto com os típicos como com os atípicos, apresenta efeito similar no que diz respeito às enzimas antioxidantes e a peroxidação lipídica (HUANG, 2010). Nossos resultados não apresentaram alterações significativas na avaliação da atividade das enzimas antioxidantes (GPx, GR, GS-T) e na dosagem TBARS. Entretanto, deve-se levar em consideração alguns parâmetros ao avaliar o estresse oxidativo, tais como: a amostra de teste (sangue, plasma ou soro), tempo de processamento da amostra (o processo rápido evita a autooxidação da GSH, por exemplo), a idade, dieta, alterações hormonais e fumo de cigarro; visto que estes fatores podem influenciar os resultados (HUANG, 2010).

Apesar disso, o conteúdo de carbonilas proteicas (outro marcador do estresse oxidativo) apresentou-se elevado nos pacientes submetidos à terapia coadjuvante com amantadina. O PCC é descrito como um amplo biomarcador de oxidação, visto que níveis elevados de carbonilação de proteínas geralmente é um sinal não só de estresse oxidativo, mas também de uma disfunção proteica associada a doença. Utilizando PCC como biomarcador de estresse oxidativo, em preferência aos produtos de peroxidação lipídica, tem-se a vantagem de que as proteínas oxidadas são geralmente mais estáveis (DALLE-DONNE, 2003).

Na doença de Parkinson (DP), tem-se observado um aumento de PCC em todas as regiões do cérebro examinadas, incluindo a substância negra, o gânglio basal, o globo pálido, córtex frontal e cerebelo. Sendo esta alteração sugerida como uma consequência do tratamento com L-DOPA (BEAL, 2002), que é convertida a dopamina nos terminais pré-sinápticos do estriado, principalmente (GOODMAN & GILMAN, 2012). O neurotransmissor dopamina é uma das principais fontes de ROS no SNC. Quando em excesso, a dopamina é rapidamente oxidada, isso pode ocorrer por duas vias: via enzimática e via não enzimática (GRIMA, 2003; FOLLMER, 2013). Na oxidação enzimática, via ação das enzimas MAO-A

ou MAO-B, além da formação do aldeído DOPAL (3,4-di-hidroxifenilacetaldeído), há a geração de peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio, na presença de  $Fe^{+2}$ , pode gerar radicais hidroxilas altamente reativos e citotóxicos. Já na oxidação não enzimática, ocorre a perda de elétrons levando à formação de dopamina orto-quinona, capaz de reagir com importantes nucleófilos celulares como tióis e proteínas (FOLLMER, 2013). Pouco se sabe a respeito do efeito da amantadina na regulação dos receptores dopaminérgicos. Contudo, é amplamente descrito na literatura que este fármaco possui uma ação monoaminérgica proeminente; age promovendo a síntese e liberação de dopamina e diminuindo a sua recaptação na fenda pré-sináptica (PEETERS, 2002). Com base nisso, podemos sugerir que a amantadina contribuiu para o aumento da oxidação proteica nos pacientes devido ao aumento da concentração de dopamina. Porém, mais estudos envolvendo um tamanho amostral maior são necessários para comprovar essa relação entre amantadina e oxidação proteica.

Deve-se ter em mente que a esquizofrenia é caracterizada por uma síndrome, portanto os resultados devem ser interpretados com cautela. Ou seja, devem avaliados considerando suas limitações. Em primeiro lugar, os nossos resultados precisam ser replicados em uma amostra maior para se ter um maior poder estatístico. E em segundo lugar, uma vez que o estudo tinha apenas 12 semanas de *follow-up*, pesquisas futuras com um maior tempo de seguimento são necessários para determinar a eficácia da amantadina, seu papel a longo prazo no tratamento adjuvante aos antipsicóticos, bem como a dosagem mais eficaz e duração do tratamento na esquizofrenia.

Este estudo contribui para um melhor entendimento sobre as bases fisiopatológicas da esquizofrenia e o possível envolvimento delas com o sistema glutamatérgico. Por fim, este é o primeiro ensaio clínico randomizado mostrando o benefício do tratamento com amantadina como complemento à terapia com antipsicóticos.

## 6. REFERÊNCIAS

ABI-DARGHAM A; LARUELLE M. Mechanisms of action of second generation antipsychotic drugs in schizophrenia: insights from brain imaging studies. *European Psychiatry*, v. 20, p. 15-27, Jan. 2005.

AGUIAR, C.C.T.; ALVES, C.D.; RODRIGUES, F.A.R.; BARROS, F.W.A.; SOUSA, F.C.F.; VASCONCELOS, S.M.M.; MACEDO, D.S. Schizophrenia: an inflammatory disease? *Jornal Brasileiro de Psiquiatria*, v.59, n.1, p. 52-57, 2010.

American Psychiatric Association, **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Diseases**, fourth edition (DSM-IV). Washington, DC: APA, 1994.

American Psychiatric Association. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders**, fifth edition (DSM-V). Washington, DC: APA, 2013.

AOKI, F.Y., SITAR, D.S. Clinical pharmacokinetics of amantadine hydrochloride. *Clinical Pharmacokinetics*, v.14, p. 35-51, 1988.

ASEVEDO, E.; GADELHA, A.; NOTO, C.; MANSUR, R.B.; ZUGMAN, A.; BELANGERO, S.I.; BERBERIAN, A.A.; SCARPATO, B.S.; LECLERC, E.; TEIXEIRA, A.L.; GAMA, C.S.; BRESSAN, R.A.; BRIETZKE, E. Impact of peripheral levels of chemokines, BDNF and oxidative markers on cognition in individuals with schizophrenia. *J Psychiatry Research*, v. 47, p. 1376-1382, Oct. 2013.

BATISTA, J.C.R. **Mecanismos de ação de substâncias antivirais**. 2011. 100f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Fernando Pessoa. Faculdade de Ciências da Saúde, Portugal, Porto, 2011.

BEAL, M.F. Oxidatively modified proteins in aging and disease. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 32, n. 9, p. 797–803, May 2002.

BERGINK, V.; GIBNEY, S.M.; DREXHAGE, H.A. Autoimmunity, inflammation, and psychosis: a search for peripheral markers. *Biol Psychiatry*, v.75, p. 324-331, Feb. 2014.

BERK, M.; COPOLOV, D.; DEAN, O.; LU, K.; JEAVONS, S.; SCHAPKAITZ, I. ET AL. N-acetyl cysteine as a glutathione precursor for schizophrenia— a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Biological Psychiatry*, v. 64, p. 361-368, Sep. 2008.

BLANPIED, T.A.; CLARKE, R.J.; JOHNSON, J.W. Amantadine inhibits NMDA receptors by accelerating channel closure during channel block. *The Journal of Neuroscience*. v. 25, p. 3312-3322, Mar. 2005.

BRADFORD, A. The dopamine and glutamate theories of schizophrenia: A short review. *Current Anaesthesia & Critical Care*, v.20, p. 240-241, Oct–Dec. 2009.

BRESSAN, R.A.; PILOWSKY, L.S. Glutamatergic hypothesis of schizophrenia. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, v.25, n.3, p.177-183, Sept. 2003.

Brunton, L.L. Goodman & Gilman. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 12<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2012.

CARLSSON, A.; WATERS, N.; CARLSSON, M.L. Neurotransmitter interactions in schizophrenia-therapeutic implications. *European Archives of Psychiatry Clinical Neuroscience*, v. 46, p. 1388-1395, Nov. 1999.

CARPENTER, S.S.; HATCHETT, A.D.; FULLER, M.A. Catatonic schizophrenia and the use of memantine. *Ann Pharmacother*, v. 40, p. 344-346, 2006.

COYLE, J.T.; BALU, D.; BENNEYWORTH, M.; BASU, A.; ROSEMAN, A. Beyond the dopamine receptor: novel therapeutic targets for treating schizophrenia. *Dialogues Clin Neurosci.*, v. 12, p. 359-382, Sep. 2010.

DADHEECH, G.; MISHRA, S.; GAUTAM, S.; SHARMA, P. Evaluation of antioxidant deficit in schizophrenia. *Indian Journal of Psychiatry*, v.50, p. 16-20, Jan-Mar. 2008.

DALLE-DONNE, I.; ROSSI, R.; GIUSTARINI, D.; MILZANI, A.; COLOMBO, R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica Chimica Acta*, v.329, p. 23-38, Mar. 2003.

DALMAU, J.; LANCASTER, E.; MARTINEZ-HERNANDEZ, E.; ROSENFELD, M.R.; BALICE-GORDON, R. Clinical experience and laboratory investigations in patients with anti-NMDAR encephalitis. *The Lancet Neurology*, v. 10, p. 63-74, Jan. 2011.

DIETRICH-MUSZALSKA, A.; KONTEK, B. Lipid peroxidation in patients with schizophrenia. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, v. 64, p. 469–475, Oct. 2010.

DIWADKAR, V. A. et al. Epigenetics, stress, and their potential impact on brain network function: a focus on the schizophrenia diatheses. *Frontiers in Psychiatry*, v. 5, p. 71, jan. 2014.

FAVALLI, G.; LI, J.; BELMONTE-DE-ABREU, P.; WONG, A.H.; DASKALAKIS, Z.J. The role of BDNF in the pathophysiology and treatment of schizophrenia. *Journal of Psychiatric Research*. v. 46, p. 1-11, Jan. 2012.

FOLLMER, C.; NETTO, H.J.C.B. Multifunctional drugs: monoamine oxidase and  $\alpha$ -synuclein as targets for the treatment of Parkinson's disease. *Química Nova*, v. 36, p. 306-313, 2013.

GAMA, C.S.; SALVADOR, M.; ANDREAZZA, A.C.; KAPCZINSKI, F.; SILVA BELMONTE-DE-ABREU, P. Elevated serum superoxide dismutase and thiobarbituric acid reactive substances in schizophrenia: a study of patients treated with haloperidol or clozapine. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, v. 30, p. 512-515, May 2006.

GAMA, C.S.; ANDREAZZA, A.C.; KUNZ, M.; BERK, M.; BELMONTE-DE-ABREU, P.S.; KAPCZINSKI, F. Serum levels of brain-derived neurotrophic factor in patients with schizophrenia and bipolar disorder. *Neuroscience Letter*, v. 420, p. 45-48, Jun. 2007.

GAMA, C.S.; SALVADOR, M.; ANDREAZZA, A.C. et al. Elevated serum thiobarbituric acid reactive substances in clinically symptomatic schizophrenic males. *Neuroscience Letters*, v. 433, p. 270-273, Jan. 2008a.

GAMA, C.S.; BERK, M.; ANDREAZZA, A.C.; KAPCZINSKI, F.; BELMONTE-DE-ABREU, P. Serum levels of brain-derived neurotrophic factor and thiobarbituric acid reactive substances in chronically medicated schizophrenic patients: a positive correlation. *Rev Brasileira de Psiquiatria*, v. 30, p. 337-340, Dec. 2008b.

GAMA, C.S.; LUCENA, D DE.; CRUZ, C. et al. Improvement of schizophrenia negative and positive symptoms with amantadine as add-on therapy to antipsychotics: a case series. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, v.32, n.2, Jun. 2010.

GETER-DOUGLASS, B., WITKIN, J.M. Behavioral effects and anticonvulsant efficacies of low-affinity, uncompetitive NMDA antagonists in mice. *Psychopharmacology*, v. 146, p. 280-289, Oct. 1999.

GRAY, L.; VAN DEN BUUSE, M.; SCARR, E. et al. Clozapine reverses schizophrenia-related behaviours in the metabotropic glutamate receptor 5 knockout mouse: association with N-methyl-d-aspartic acid receptor up-regulation. *Int J Neuropsychopharmacol*, v. 12, p. 45-60, July 2009.

GRIMA, G.; BENZ, B.; PARPURA, V.; CUENOD, M.; DO, K.Q. Dopamine-induced oxidative stress in neurons with glutathione deficit: implication for schizophrenia. *Schizophrenia Research*, v. 62, p. 213-224, Aug. 2003.

HÄFNER, H.; MAURER, K. Early detection of schizophrenia: current evidence and future perspectives. *World Psychiatry*, v. 7, p.130-138, Oct. 2008.



HALLER, C.S.; PADMANABHAN, J.L.; LIZANO, P.; TOROUS, J.; KESHAVAN, M. Recent advances in understanding schizophrenia. *F1000Prime Reports*, 6:57, July. 2014.

HASHIMOTO T.; BERGEN S.E.; NGUYEN Q.L.; XU B.; MONTEGGIA L.M.; PIERRI J.N. *et al.* Relationship of brain-derived neurotrophic factor and its receptor TrkB to altered inhibitory prefrontal circuitry in schizophrenia. *Journal of Neuroscience*, v.25, p. 372-383, Jan. 2005.

HIGLEY, M.J.; PICCIOTTO, M.R. Neuromodulation by acetylcholine: examples from schizophrenia and depression. *Current Opinion in Neurobiology*, v. 29, p. 88-95, Dec. 2014.

HOSENBOSCH, S.; CHAHAL, R. Amantadine: A Review of Use in Child and Adolescent Psychiatry. *Journal of the Canadian Academy of Child and Adolescent Psychiatry*, v.22, p. 55-60, Feb. 2013.

HUANG, E.Y.-K.; TSUI, P.-F.; KUO, T.-T.; TSAI JR.J.; CHOU, Y.-C.; MA, H.-I.; CHIANG, Y.-H.; CHEN, Y.-H. Amantadine ameliorates dopamine-releasing deficits and behavioral deficits in rats after fluid percussion injury. *PLoS One.*, published online, Jan. 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0086354.

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

INSEL, T.R. Rethinking schizophrenia. *Nature*. v. 468, p. 187-193, Nov. 2010.

KORNHUBER, J., WELLER, M., SCHOPPMAYER, K., RIEDERER, P. Amantadine and memantine are NMDA receptor antagonists with neuroprotective properties. *Journal of Neural Transmission Supplementum*, v. 43, p. 91-104, 1994.

KUNZ, M.; GAMA, C.S.; ANDREAZZA, A.C.; SALVADOR, M.; CERESÉR, K.M.; GOMES, F.A.; BELMONTE-DE-ABREU, P.S.; BERK, M.; KAPCZINSKI, F. Elevated serum superoxide dismutase and thiobarbituric acid reactive substances in different phases of bipolar disorder and in schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, v. 32, p. 1677-1681, Oct. 2008.

KUNZ, M.; CERESÉR, K.M.; GOI, P.D.; FRIES, G.R.; TEIXEIRA, A.L.; FERNANDES, B.S.; BELMONTE-DE-ABREU, P.S.; KAUER-SANT'ANNA, M.; KAPCZINSKI, F.; GAMA, C.S. Serum levels of IL-6, IL-10 and TNF- $\alpha$  in patients with bipolar disorder and schizophrenia: differences in pro- and anti-inflammatory balance. *Rev Brasileira Psiquiatria*, v. 33, p. 268-274, Sep. 2011.

LÖSCHER, W.; KLOTZ, U.; ZIMPRICH, F.; SCHMIDT, D. The clinical impact of pharmacogenetics on the treatment of epilepsy. *Epilepsia*, v. 50, p. 1-23, Jan. 2009.

LUCENA, D.F.; FERNANDES, B.S.; BERK, M.; DODD, S.; MEDEIROS, D.W.; PEDRINI, M.; KUNZ, M.; GOMES, F.A.; GIGLIO, L.F.; LOBATO, M.I.; BELMONTE-DE-ABREU, P.S.; GAMA, C.S. Improvement of negative and positive symptoms in treatment-refractory schizophrenia: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial with memantine as add-on therapy to clozapine. *Journal of Clinical Psychiatry*, v. 70, p. 1416-1423, Oct. 2009.

LUCENA, D.F.; PINTO, J.P.; HALLAK, J.E.; CRIPPA, J.A.; GAMA, C.S. Short-term treatment of catatonia with amantadine in schizophrenia and schizoaffective disorder. *Journal of Clinical Psychopharmacology*. v. 32, p. 569-572, Aug. 2012.

LÜLLMANN, HEINZ; MOHR, KLAUS; HEIN, LUTZ. **Farmacologia - Texto e Atlas**. 5ed. São Paulo: ARTMED, 2008.

MARI, J.J.; LEITÃO, R.J. A epidemiologia da esquizofrenia. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, v.22, s.1, p. 15-17, July-Ago. 2000.

MASSUDA, R.; PEDRINI, M.; RECKZIEGEL, R.; COSTANZI, M.; FERRARI, P.; GUBERT, C.; GAMA, C.S. Elevated serum protein oxidative stress in siblings of patients with schizophrenia. *Schizophrenia Research*, v. 147, p. 398-399, July 2013.

Massuda, Rafael *et al.* **Transtornos Psicóticos**. In: Mari, Jair de Jesus; Kieling, Christian. **Psiquiatria na Prática Clínica**. São Paulo: Monoele, 2013.

MCEVOY, J.P.; MCCUE, M.; FRETER, S. Replacement of chronically administered anticholinergic drugs by amantadine in outpatient management of chronic schizophrenia. *Clinical Therapeutics*, v. 9, p. 429-433, 1987.

MCGRATH, J.; SAHA, S.; WELHAM, J.; EL SAADI, O.; MACCAULEY, C. CHANT, D. A systematic review of the incidence of schizophrenia: the distribution of rates and the influence of sex, urbanicity, migrant status and methodology. *BMC Medicine*, 2:13, Apr. 2004.

MEHTA, A.; PRABHAKAR, M.; KUMAR, P.; DESHMUKH, R.; SHARMA, P.L. Excitotoxicity: bridge to various triggers in neurodegenerative disorders. *European Journal of Pharmacology*, v. 698, p. 6-18, Jan. 2013.

MEISNER, F.; SCHELLER, C.; KNEITZ, S. *et al.* Memantine upregulates BDNF and prevents dopamine deficits in SIV-infected macaques: a novel pharmacological action of memantine. *Neuropsychopharmacology*, v. 33, p. 2228–2236, Oct. 2008.

MITCHELMORE, C.; GEDE, L. Brain derived neurotrophic factor: Epigenetic regulation in psychiatric disorders. *Brain Research*. v. 1586, p. 162-172, Oct. 2014.

MIYAKE, N.; THOMPSON, J.; SKINBJERG, M.; ABI-DARGHAM, A. Presynaptic dopamine in schizophrenia. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, v. 17, p. 104-109, Apr. 2011.

MÜLLER, N.; SCHWARZ, M.J. A psychoneuroimmunological perspective to Emil Kraepelin's dichotomy: schizophrenia and major depression as inflammatory CNS disorders. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, v.258, s. 2, p. 97-106, Jun. 2008.

MÜLLER, N.; RIEDEL, M.; GRUBER, R.; ACKENHEIL, M.; SCHWARZ, M.J. The Immune System and Schizophrenia: An Integrative View. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 917, p. 456-467, 2006.

Nardi, Antonio Egidio; Quevedo, João; Silva, Antônio Geraldo da. **Esquizofrenia: Teoria e Clínica**. Porto Alegre: Artmed, 2014.

NG, F.; BERK, M.; DEAN, O.; BUSH, A.I. Oxidative stress in psychiatric disorders: evidence base and therapeutic implications. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, v. 11, p. 851-876, Sep. 2008.

NIETO, R.; KUKULJAN, M.; SILVA, H. BDNF and schizophrenia: from neurodevelopment to neuronal plasticity, learning, and memory. *Frontiers in Psychiatry*, v. 4, Jun. 2013.

OHLMEIER, M.D.; ZHANG, Y.; BODE, L.; SIEG, S.; FEUTL, S.; LUDWIG, H.; EMROCH, H.M.; DIETRICH, D.E. Amantadine reduces mania in borna disease virus-infected non-psychotic bipolar patients. *Pharmacopsychiatry*, v. 41, p. 202-203, Sep. 2008.

OKUSAGA, O.O. Accelerated Aging in Schizophrenia Patients: The Potential Role of Oxidative Stress. *Aging and Disease*, v. 5, p. 256-262, Dec. 2013.

OVERALL, J.E.; & GORHAM, D.R. The brief psychiatric rating scale. *Psychology Report*, v. 10, p.799-812, 1962.

PARKES, J.D.; CALVER, D.M.; ZILKHA, K.J.; KNILL-JONES, R.P. Controlled trial of amantadine hydrochloride in Parkinson's disease. *Lancet*, v. 295, p.259-262, Feb. 1970.

PAZ, R.D.; TARDITO, S.; ATZORI, M.; TSENG, K.Y. Glutamatergic dysfunction in schizophrenia: From basic neuroscience to clinical psychopharmacology. *European Neuropsychopharmacology*, v. 18, p.773-786, Nov. 2008.

PEDRINI, M.; CHENDO, I.; GRANDE, I.; LOBATO, M.I.; BELMONTE-DE-ABREU, P.S.; LERSCH, C.; WALZ, J.; KAUER-SANT'ANNA, M.; KAPCZINSKI, F.; GAMA, C.S. Serum brain-derived neurotrophic factor and clozapine daily dose in patients with schizophrenia: a positive correlation. *Neuroscience Letter*, v. 491, p. 207-210, Mar. 2011.

PEDRINI, M.; MASSUDA, R.; DE LUCENA, D.; MACÊDO, D.; PAZ, A.V.; LOBATO, M.I.; BELMONTE-DE-ABREU, P.S.; CERESÉR, K.M.; ROCHA, N.P.; CURRA, M.D.; PANIZZUTTI, B.S.; TEIXEIRA, A.L.; GAMA, C.S. Differences in eotaxin serum levels patients with recent onset and in chronic stable schizophrenia: a clue for understanding accelerating aging profile. *Schizophrenia Research*, v. 152, p. 528-529, Feb. 2014.

PEETERS, M.; PAGE, G.; MALOTEAUX, J.M.; HERMANS, E. Hypersensitivity of dopamine transmission in the rat striatum after treatment with the NMDA receptor antagonist amantadine. *Brain Research*, v. 949, p. 32-41, Sep. 2002.

PLITMAN, E.; NAKAJIMA, S.; FUENTE-SANDOVA, L.C.; GERRETSEN, P.; CHAKRAVARTY, M.M.; KOBYLIANSKII, J.; CHUNG, J.K.; CARAVAGGIO, F.; IWATA, Y.; REMINGTON, G.; GRAFF-GUERRERO, A. Glutamate-mediated excitotoxicity in schizophrenia. *European Neuropsychopharmacology*, v. 24, p.1591-1605, Oct. 2014.

PILLAI, A. Brain-derived neurotrophic factor/TrkB signaling in the pathogenesis and novel pharmacotherapy of schizophrenia. *Neurosignals*, v. 16, p. 183-193, Feb. 2008.

QIAN, L.; ZHAO, J.; SHI, Y.; ZHAO, X.; FENG, G.; XU, F.; ZHU, S.; HE, L. Brain-derived neurotrophic factor and risk of schizophrenia: An association study and meta-analysis. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 353, p. 738-743, Feb.2007.

RAFFA, M.; ATIG, F.; MHALLA, A.; KERKENI, A.; MECHRI, A. Decreased glutathione levels and impaired antioxidant enzyme activities in drug-naïve first-episode schizophrenic patients. *BMC Psychiatry*, Aug. 2011, doi:10.1186/1471-244X-11-124.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; GARDNER, P. **Farmacologia**. Elsevier, 6<sup>a</sup> ed. 2007.

RANJEKAR, P.K.; HINGE, A.; HEGDE, M.V.; GHATE, M.; KALE, A.; SITASAWAD, S.; WAGH, U.V.; DEBSIKDAR, V.B.; MAHADIK, S.P. Decreased antioxidant enzymes

and membrane essential polyunsaturated fatty acids in schizophrenic and bipolar mood disorder patients. *Psychiatry Research*, v. 121, p. 109–122, Dec. 2003.

RIZOS, E.; PAPATHANASIOU, M.A.; MICHALOPOULOU, P.G.; LASKOS, E.; MAZIOTI, A.; KASTANIA, A.; VASILOPOULOU, K.; NIKOLAIDOU, P.; MARGARITIS, D.; PAPAGEORGIU, C.; LIAPPAS, I. A longitudinal study of alterations of hippocampal volumes and serum BDNF levels in association to atypical antipsychotics in a sample of first-episode patients with schizophrenia. *PLoS One*, v. 13, e87997, Feb. 2014. doi: 10.1371/journal.

RUGGIERO, R.N.; BUENO-JÚNIOR, L.S.; ROSS, J.B. DE; FACHIM, H.A.; PADOVAN-NETO, F.E.; MERLO, S. ET AL. Glutamatergic neurotransmission and synaptic plasticity: molecular, clinical, and phylogenetic aspects. *Medicina*, v. 44, p. 143-56, 2011.

SCARR, E., GIBBONS, A. S., NEO, J., UDAWELA, M., AND DEAN, B. Cholinergic connectivity: it's implications for psychiatric disorders. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, v. 7, May 2013.

SCHULTZ, S.H.; NORTH, S.W.; SHIELDS, C.G. Schizophrenia: A Review. *American Family Physician*, v. 75, p.1821-1829, July 2007.

SCHWIELER, L.; ENGBERG, G.; ERHARDT, S. Clozapine modulates midbrain dopamine neuron firing via interaction with the NMDA receptor complex. *Synapse*, v. 52, p.114-122, May 2004.

SCHWIELER, L.; LINDERHOLM, K.R.; NILSSON-TODD, L.K.; ERHARDT, S.; ENGBERG, G. Clozapine interacts with the glycine site of the NMDA receptor: Electrophysiological studies of dopamine neurons in the rat ventral tegmental area. *Life Sciences*, v. 83, p. 170-175, Aug. 2008.

Stahl, Stephen M. **Stahl's Essential Psychopharmacology: Neuroscientific Basis and Practical Applications**. 4ed. Cambridge University Press: November 2013, 620p.

STEULLET, P.; CABUNGAL, J.H.; MONIN, A.; DWIR, D.; O'DONNELL, P.; CUENOD, M.; DO, K.Q. Redox dysregulation, neuroinflammation, and NMDA receptor hypofunction: A “central hub” in schizophrenia pathophysiology? *Schizophrenia Research*. July 2014, doi: 10.1016/j.schres.2014.06.021.

STUART, M.J.; BAUNE, B.T. Chemokines and chemokine receptors in mood disorders, schizophrenia, and cognitive impairment: A systematic review of biomarker studies. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, v. 42, p. 93-115, May 2014.

TEIXEIRA, A.L.; REIS, H.J.; NICOLATO, R.; BRITO-MELO, G.; CORREA, H.; TEIXEIRA, M.M.; ROMANO-SILVA, M.A. Increased serum levels of CCL11/eotaxin in schizophrenia. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, v. 32, p. 710-714, Apr. 2008.

TOIDE, K. Effects of amantadine on dopaminergic neurons in discrete regions of the rat brain. *Pharmaceutical Research*, v. 7, p. 670-672, Jun. 1990.

TRAMONTINA, J.F.; ANDREAZZA, A.C.; KAUER-SANT'ANNA, M.; STERTZ, L.; GOI, J.; CHIARANI, F.; KAPCZINSKI, F. Brain-derived neurotrophic factor serum levels before and after treatment for acute mania. *Neuroscience Letter*, v. 452, p. 111-113, Mar. 2009.

TSAI, G.E.; YANG, P.; CHUNG, L.C.; TSAI, I.C.; TSAI, C.W.; COYLE, J.T. D-serine added to clozapine for the treatment of schizophrenia. *The American Journal of Psychiatry*, v. 156, p. 1822-1825, Nov. 1999.

VAZ-SERRA, A. *et AL*. Cognição, cognição social e funcionalidade na esquizofrenia. *Acta Med Port*, v. 23, p. 1043-1058, 2010.

VENTURA, A.L.M.; ABREU, P.A.; FREITAS, R.C.C.; SATHLER, P.C.; LOUREIRO, N.; CASTRO, H.C. Cholinergic system: revisiting receptors, regulation and the relationship with Alzheimer disease, schizophrenia, epilepsy and smoking. *Revista de Psiquiatria Clínica*, v. 37, n.2, Maio 2009.

YAO, J.K.; LEONARD, S.; REDDY, R. Altered glutathione redox state in schizophrenia. *Disease Markers*, v. 22, p. 83-93, Dec. 2006.

YOSHIMURA, R.; HORI, H.; SUGITA, A.; UEDA, N.; KAKIHARA, S.; UMENE, W.; NAKANO, Y.; SHINKAI, K.; MITOMA, M.; OHTA, M.; SHINKAI, T.; NAKAMURA, J. Treatment with risperidone for 4 weeks increased plasma 3-methoxy-4-hydroxypnenylglycol (MHPG) levels, but did not alter plasma brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in schizophrenic patients. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, v. 31, p. 1072-1077, Jun. 2007.