



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS  
HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE  
LABORATÓRIO DE PSIQUIATRIA MOLECULAR**

**Dissertação de Mestrado:**

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE ANEXINA V E TNF- $\alpha$  EM  
PACIENTES CRÔNICOS ESTÁVEIS COM ESQUIZOFRENIA: UMA DEFESA  
ORQUESTRADA?**

**Lenise Petter Francesconi**

**ORIENTADOR**

**Paulo Silva Belmonte de Abreu**

**PORTO ALEGRE**

**2011**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS  
HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE  
LABORATÓRIO DE PSIQUIATRIA MOLECULAR**

**Dissertação de Mestrado:**

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE ANEXINA V E TNF- $\alpha$  EM  
PACIENTES CRÔNICOS ESTÁVEIS COM ESQUIZOFRENIA: UMA DEFESA  
ORQUESTRADA?**

Lenise Petter Francesconi

*Tese apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Medicina:  
Ciências Médicas, da Universidade  
Federal do Rio Grande do Sul, para  
obtenção do título de Mestre em  
Ciências Médicas.*

**PORTO ALEGRE, JANEIRO 2011**

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar a Deus, por mais uma conquista. Sempre me dando muita coragem e fé para eu realizar os meus sonhos.

Ao meu marido Claudio pela força, e compreensão. Por estar sempre ao meu lado nos momentos mais difíceis. TE AMO.

Aos meus pais, Oscar e Beatriz , meus grandes incentivadores. Abriam mão de seus sonhos em muitos momentos para que eu pudesse realizar os meus.

Ao meu orientador, Prof. Paulo Abreu, por ter me dado um voto de confiança. Pela acolhida, generosidade, estímulo e exemplo. Exemplo de competência e de sabedoria, o meu MUITO OBRIGADA!

A minha grande e incansável amiga, Keila Ceresér, pelo carinho e dedicação. Muito obrigado é pouco para expressar tudo o que tu fizeste por mim.

A minha amiga, Ana Lúcia Abujamra, sempre disposta a me ajudar.

A Clarissa Gama que sempre dividiu os seus conhecimentos para me auxiliar na conclusão da dissertação.

A todos do grupo de pesquisa do Laboratório de Psiquiatria Molecular, que sempre me estenderam a mão quando eu precisei.

Aos pacientes e voluntários que participaram do estudo pela compreensão e disponibilidade.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO .....</b>	<b>5</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>6</b>
<b>1.1 Esquizofrenia .....</b>	<b>6</b>
<b>1.2 Anexina .....</b>	<b>9</b>
<b>1.3 TNF-<math>\alpha</math> .....</b>	<b>11</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>15</b>
<b>2.1 Objetivo Primário .....</b>	<b>15</b>
<b>2.2 Objetivos Secundários .....</b>	<b>15</b>
<b>3. ARTIGO SUBMETIDO .....</b>	<b>16</b>
<b>4. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>32</b>
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>33</b>
<b>6. ANEXOS .....</b>	<b>35</b>

## RESUMO

A esquizofrenia é um dos transtornos psiquiátricos mais importantes, porque afeta pessoas jovens, com evolução em geral para incapacitação funcional e prejuízo social, atingindo cerca de 1% da população. Apresenta igual distribuição entre os sexos, manifestando-se clinicamente no final da adolescência, tendo seu pico entre 15-25 anos, com um forte fator hereditário na sua etiologia. A farmacoterapia tem provado ser o ponto chave na terapêutica da esquizofrenia. É também conhecida a alta incidência de processos inflamatórios em pacientes esquizofrênicos. Os processos apoptóticos alteram a rede neuronal e estão envolvidos na patogênese de várias doenças neurodegenerativas, entre elas, a esquizofrenia. As anexinas pertencem a uma família de proteínas que ligam ambos o cálcio e os fosfolipídios e formam canais de cálcio voltagem dependentes dentro de bicamadas lipídicas planas (Pollard and Rojas, 1988). São associadas com a regulação dos processos de fagocitose, sinalização celular, apoptose e migração leucocitária; sendo uma proteína inibidora citosólica da fosfolipase A2, podem regular vários componentes da reação inflamatória, tais como as citocinas (Damazo, 2006).

Fator de necrose tumoral (TNF) é uma citocina envolvida em inflamações sistêmicas e é membro de um grupo de citocinas que estimulam a reação de fase aguda. O fator de necrose tumoral causa a morte apoptótica da célula, proliferação celular, diferenciação, inflamação, origina tumores e replicação viral.

O objetivo deste estudo foi avaliar a anexina V e níveis séricos de TNF- $\alpha$  em pacientes com diagnóstico de esquizofrenia e controles. Houve uma diferença significativa na anexina-V e níveis de TNF- $\alpha$  entre pacientes e controles ( $p < 0,001$ ). Os altos níveis de anexina em pacientes com diagnóstico de esquizofrenia podem ser responsáveis pelos níveis reduzidos de TNF- $\alpha$ , devido à sua ação antiinflamatória.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Esquizofrenia

A esquizofrenia é uma doença mental com alta taxa de cronicidade, caracterizada por distorções do pensamento, delírios bizarros, alterações na sensopercepção e respostas emocionais inadequadas, que podem levar o paciente a algum grau de deterioração. Critérios diagnósticos claros baseados em características fenomenológicas são apresentados no DSM IV (APA, 1994).

É uma doença que atinge 1% da população e que se caracteriza por ser grave e produzir uma deterioração do funcionamento cognitivo do indivíduo. Costuma ocorrer no final da adolescência e início da vida adulta, afetando ambos os sexos. A patologia tende a interferir no desempenho escolar e profissional destes pacientes, que terão dificuldade de ingressar na universidade e até concluir estudos, além de dificuldade de assumir posições de trabalho que exijam maior responsabilidade. Como resultado, o status sócio-econômico destes pacientes é reduzido.

No momento, não é possível prevenir a esquizofrenia. Dessa forma, o foco comum é o tratamento e a reabilitação do paciente. A farmacoterapia tem provado ser o ponto chave na terapêutica da esquizofrenia. Embora não curativos, os fármacos antipsicóticos se estabeleceram como o tratamento primário para todos os estágios da doença, possibilitando uma redução no tempo de hospitalização e a possibilidade de manutenção dos pacientes por mais tempo em seus lares (Marder et al., 1991; Gama et al., 2004).

Mais de 20% de todos os pacientes se mantêm refratários ao tratamento com antipsicóticos clássicos (Davis, 1980; Haring et al., 1990). Mesmo com a alta frequência de sintomas persistentes em pacientes esquizofrênicos, poucos tratamentos alternativos têm surgido como auxílio efetivo.

Na prática os antipsicóticos são divididos em dois grupos relativamente

consensuais apesar de atualmente serem contestados, devido a grande variabilidade entre os fármacos.

- Típicos (ou de 1ª geração): clorpromazina, haloperidol, flufenazina, tioridazina, flupentixol, e zuclopentixol.

- Atípicos: (ou segunda geração): clozapina, risperidona, olanzapina, sertindole e, mais recentemente, aripiprazol e ziprazidona.

A diferenciação entre os dois grupos baseia-se na propensão de indução de efeitos colaterais extrapiramidais, sendo que somente a Clozapina apresenta clara diferença de eficácia no grupo de pacientes resistentes ao tratamento (Kane et al., 1998; Reis et al., 2007).

A clozapina é um antipsicótico atípico, por ter características distintas das medicações disponíveis antes de seu lançamento, que mostrou eficácias em 30 a 60% das psicoses que não respondem aos fármacos clássicos e baixa incidência de efeitos adversos (Gama et al., 2004) sendo então a principal indicação para a esquizofrenia refratária (Morais e Oliveira., 2006).

É também conhecida a alta incidência de processos inflamatórios em pacientes esquizofrênicos. Em uma revisão realizada por Potvin e colaboradores (2008) foram encontradas evidências de uma relação entre esquizofrenia e processo inflamatório.

Os processos apoptóticos alteram a rede de conexão neuronal e estão envolvidos na patogênese de diversas doenças neurodegenerativas, entre elas a esquizofrenia (Kalinichenko and Matveeva, 2008).

A apoptose é regulada por uma cascata do complexo molecular que controla a ativação da família da cisteína protease, conhecida como proteína caspase (Friedlander, 2003). A regulação alterada da cascata apoptótica pode reduzir potencialmente a viabilidade neuronal e glial de vários estágios do desenvolvimento e contribuir para o *deficit* volumétrico e funcional do cérebro, observado na esquizofrenia (Berger et al., 2003; Jarskog et al., 2005).

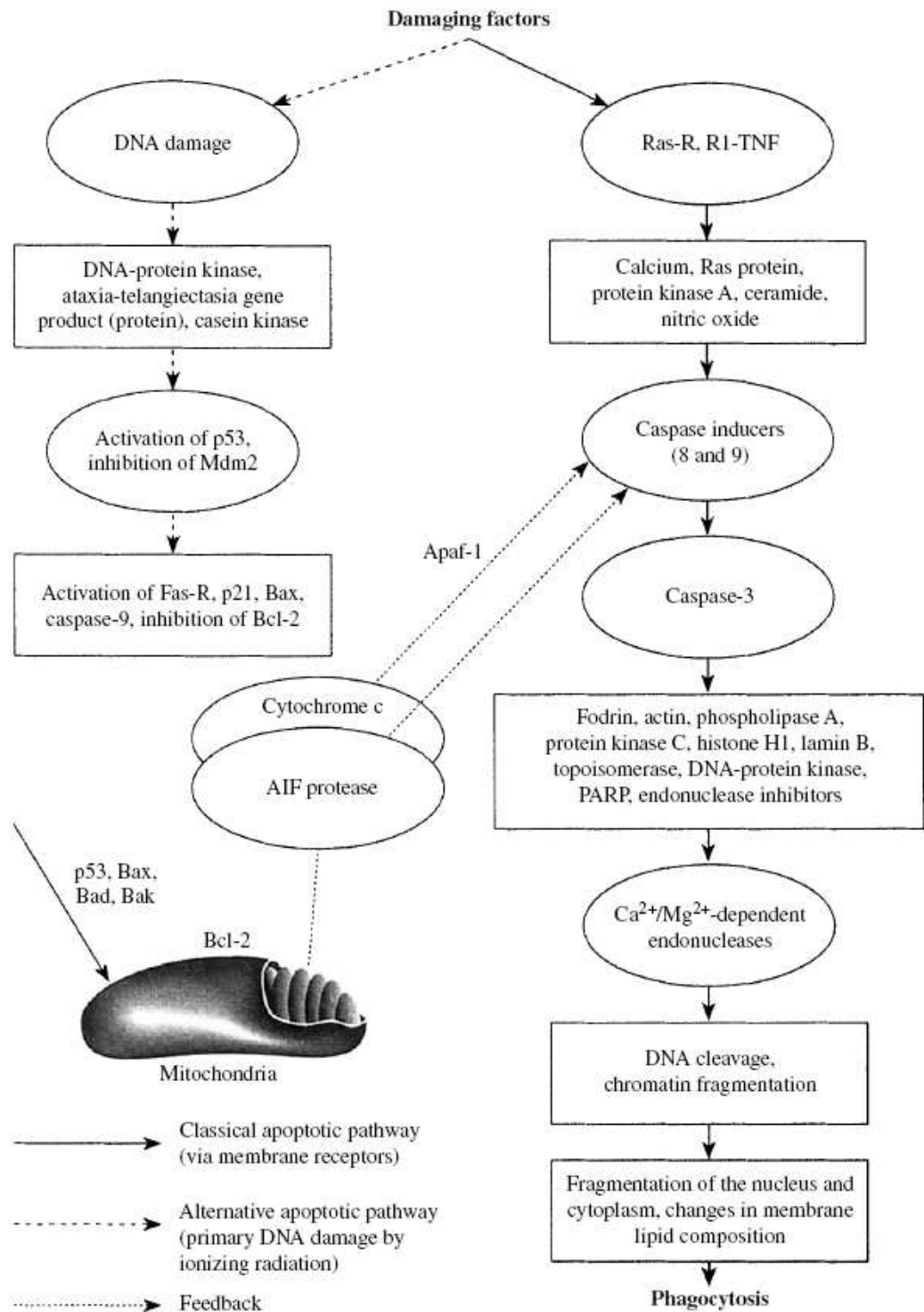


FIGURA 1. Representação da interação de fatores intracelulares na apoptose (Kalinichenko and Matveeva, 2008).



## 1.2 Anexina

As anexinas são proteínas solúveis em água que possuem uma superfície hidrofílica (Edwards and Crumpton, 1991; Courie and Wood, 2000), sendo distribuídas amplamente em diversos organismos, tecidos e tipos celulares. Pertencem a uma família de proteínas que ligam ambos o cálcio e os fosfolipídios e formam canais de cálcio voltagem dependentes dentro de bicamadas lipídicas planas (Pollard and Rojas, 1988). São associadas com a regulação dos processos de fagocitose, sinalização celular, apoptose e migração leucocitária; sendo uma proteína inibidora citosólica da fosfolipase A2, pode regular vários componentes da reação inflamatória, tais como as citocinas (Damazo, 2006).

Morgan e Fernandez (1997) constataram que existem cerca de 94 anexinas encontradas em 45 espécies de todos os reinos eucarióticos exceto fungos. Contudo, apesar das semelhanças estruturais, as anexinas variam entre si relativamente quanto a, pelo menos, duas propriedades: a concentração de  $Ca^{2+}$  necessária para a ligação aos fosfolipídios e a afinidade para os diferentes tipos de fosfolipídios (Ernst, Mall and Chew, 1994). Portanto, os diversos tipos de anexinas diferem também relativamente à sua localização celular e à função biológica que desempenham. Estruturalmente, as anexinas são constituídas por uma cauda, na proximidade da extremidade amina, que apresenta características variáveis de acordo com o tipo de proteína, e por uma região com maior grau de conservação entre os membros da família das anexinas, na proximidade da extremidade carboxílica (Kim et al., 2001). As anexinas I - VIII foram bem diferenciadas nos vertebrados (Crumpton e Dedman, 1990).

A anexina V foi detectada nos espaços extracelulares, por exemplo, a artéria do cordão umbilical humano (Van Engeland et al., 1998), no plasma sanguíneo, (Raynal et al., 1993) e no plasma seminal (Melki et al., 1995). Está situada no citoplasma da maioria dos tipos de célula, é encontrada no núcleo das células SH- SY5Y (Blanchard et al., 1996) e faz parte da matriz nuclear

interna (Altieri et al.1996). Ambas anexinas IV e V são encontradas nos envelopes nucleares de fibroblastos (Raynal et al.1996).

A massa molecular da anexina V (endonexina II) é de aproximadamente  $37 \pm 2$  KDa. Huber et al. (1992) comparou a seqüência de aminoácidos da anexina V humana com outras anexinas, encontrando intensas semelhanças.

Raynal e Pollard (1994) salientaram a grande gama de semelhanças biofísicas realizadas pela anexina, tanto a nível celular e multicelular, como aquelas comumente observadas, por exemplo, a atividade de canal iônico e a fusão das membranas celulares para a regulação da síntese de DNA e formação óssea.

Geralmente considera-se que a anexina trabalhe internamente na membrana citoplasmática. Contudo, também tem sido relatado que a anexina V pode ter função fora da célula, proporcionando um local para rápida cristalização sem penetrar na membrana fosfolipídica (Reutelingsperger and van Heerde, 1997).

O papel da anexina V na coagulação durante a apoptose foi analisado (Reutelingsperger and van Heerde, 1997), causando inibição de atividades pró-coagulantes e pró- inflamatórias.

A anexina V parece ter pelo menos um fator secundário no progresso de células patológicas. Até agora as anexinas que têm sido correlacionadas com algumas patologias incluem a anexina V, a reguladora da inflamação catalisada pela fosfatidilserina e coagulação durante a apoptose (Reutelingsperger and van Heerde, 1997).

A anexina V é um poderoso anticoagulante (Huber et al., 1992), talvez porque ela possa interferir na fixação da membrana da fosfolipase A2.

Reutelingsperger e van Heerde (1997) consideraram que a anexina V pode inibir atividades pró-coagulantes e pró-inflamatórias de fosfolipídios de

carga negativa que são expostos na superfície da membrana através da maquinaria molecular ativada por apoptose. Desde que a anexina V não seja completamente bloqueada pela fagocitose de células danificadas (Mizutani et al., 1993), Reutelingsperger e van Heerde (1997) sugeriram que a anexina V age como um agente seletivo contra a inflamação e a coagulação nos locais de dano.

### **1.3 TNF- $\alpha$**

De acordo com suas atividades biológicas, as citocinas são classificadas em: a) pró-inflamatórias, onde exercem função de destaque a IL-1, a IL-2, o fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e o IFN; b) das doenças alérgicas e das parasitoses, representadas por IL-4, IL-5 e IL-6; c) imunossupressoras, como as IL-10, IL-13 e IL-19; d) estimuladoras de crescimento de colônias, ou seja, IL-3, IL-7, IL-9, IL-11, IL-14 e IL-17; e) quimiocinas, onde ressalta-se a IL-8 (Forte, 2004).

Fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) é uma citocina envolvida em inflamações sistêmicas e é um membro de um grupo de citocinas que estimulam a reação de fase aguda. O fator de necrose tumoral causa a morte apoptótica da célula, proliferação celular, diferenciação, inflamação, origina tumores e replicação viral.

O TNF- $\alpha$  é proteína com peso molecular de 17 quilo-Daltons (kD); é composta por 157 aminoácidos e contém uma ponte dissulfídica ligada a dois resíduos cisteínicos (Shalaby et al, 1986; Beutler & Cerami, 1988).

O fator é sintetizado principalmente por macrófagos e monócitos. O TNF- $\alpha$  é expresso na membrana citoplasmática do macrófago como um trímero de 51 kD, com forma piramidal; cada face é formada por uma subunidade de 17 kD (Abbas et al, 2000).

O TNF- $\alpha$  produzido liga-se a receptores específicos da membrana celular, denominados receptores de TNF (TNF-R) I e II. Estes receptores estão

presentes em praticamente todas as células do nosso organismo, dos quais o tipo I parece ser o mais importante. No citoplasma, ativam uma família de proteínas denominada fatores associados aos receptores do fator de necrose tumoral (Abbas et al, 2000; Bingham 3rd, 2002).

A principal função do TNF- $\alpha$  é promover a resposta imune, por meio do recrutamento de neutrófilos e monócitos para o local da infecção, além de ativá-los (Abbas et al, 2000).

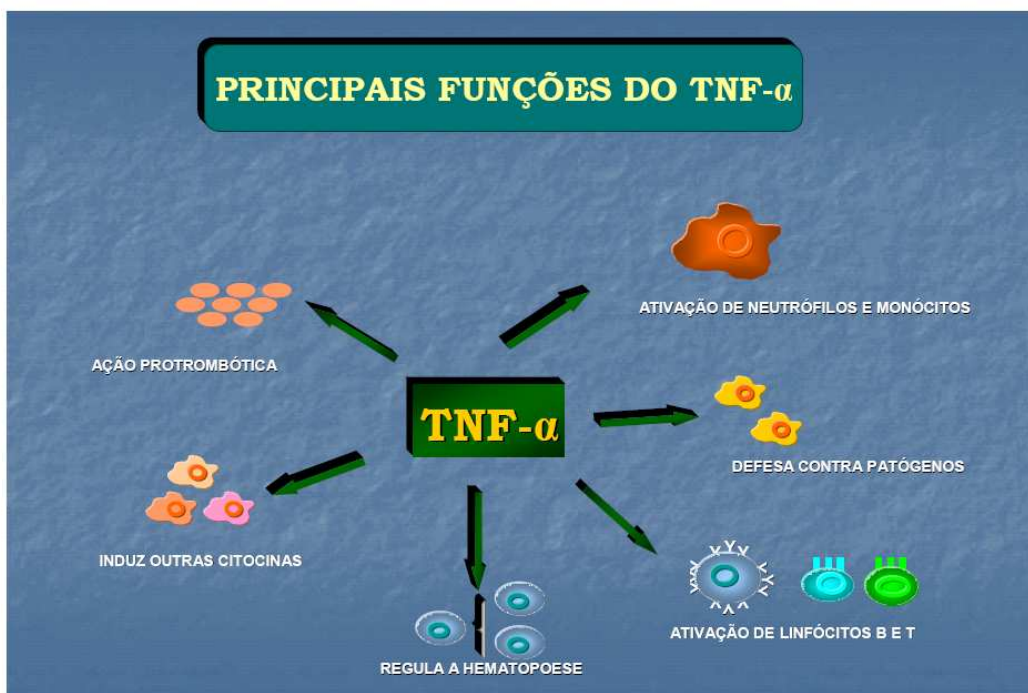


Figura 2. Funções do TNF- $\alpha$  (adaptado de Roitt, 1999).

O TNF- $\alpha$  age nas células endoteliais; ativa a expressão de novos receptores celulares, que irão promover a adesão de neutrófilos, monócitos e linfócitos. Também estimula as células endoteliais a secretarem as quimiocinas com ação quimiotática sobre os leucócitos (Abbas et al, 2000).

Desta forma, o TNF- $\alpha$  tem diversas ações benéficas ao organismo quando sintetizado em quantidades moderadas; porém, acredita-se que tenha

importante ação deletéria quando produzido em quantidades excessivas (Forte, 2004).

Entre explicações etiológicas da esquizofrenia, várias hipóteses correlacionam doenças imunes tais como: infecções e doença inflamatória auto-imune (Haring et al., 1990, Potvin et al., 2008). Uma das abordagens para investigar essa literatura é examinar evidências baseadas em estudos que quantificam citocinas.

Alterações na rede de citocinas na esquizofrenia podem ser secundárias também ao tratamento antipsicótico, que tem demonstrado um impacto significativo no sistema imunológico ((Haring et al., 1990, Potvin et al., 2008).

Vários estudos indicaram que as citocinas podem estar envolvidas na patofisiologia da esquizofrenia. Alguns estudos encontraram a concentração de TNF- $\alpha$  aumentada (Stefanis et al., 1994; Naudin et al., 1997; Theodoropoulou et al., 2001), enquanto que outros não encontraram mudanças na concentração de TNF- $\alpha$  (Xu et al., 1994).

No estudo de O' Brien e colaboradores o maior achado foi que pacientes com esquizofrenia tiveram marcadamente um aumento na concentração plasmática das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  (Th1) com uma redução concomitante na citocina antiinflamatória IL-4 (Th2), quando comparada com pacientes sadios. A concentração elevada do TNF- $\alpha$  concorda com os achados de Stefanis et al. (1994), Naudin et al. (1997) e Theodoropoulou et al. (2001).

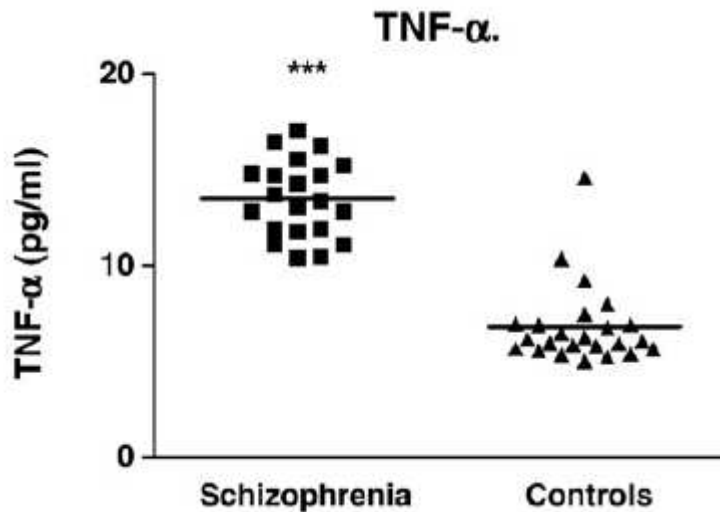


Figura 3. Perfil do TNF- $\alpha$  na esquizofrenia,  $P < 0,0001$  (modificado de O'Brien et al., 2008).

Haloperidol e clozapina reduzem a expressão de TNF- $\alpha$  no córtex pré-frontal de ratos (PAE et al., 2006).

Antagonistas do TNF- $\alpha$  podem ter um papel no futuro tratamento da esquizofrenia. Maior compreensão do papel do TNF- $\alpha$  na esquizofrenia podem ser alcançados através da análise de NF $\kappa$ B e I $\kappa$ B $\alpha$ . (O'Brien et al., 2008).

Como a anexina V é um inibidor da fosfolipase A, tendo, teoricamente, ação anti-inflamatória e o TNF- $\alpha$  é um agente pró-inflamatório, surgiu o interesse de avaliarmos a concentração destes biomarcadores na esquizofrenia. Além disso, não há estudos sobre a ação destes dois biomarcadores juntos nesta patologia.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Primário**

Determinar os níveis séricos de anexina V e TNF- $\alpha$  em pacientes com esquizofrenia.

### **2.2 Objetivos Secundários**

- Determinar se existe diferença entre os níveis séricos de anexina V e/ou TNF- $\alpha$  entre pacientes com esquizofrenia e controles sem transtornos psiquiátricos.
- Determinar se existe correlação entre os níveis de anexina V e/ou TNF- $\alpha$  e o tempo e curso de doença.
- Determinar se existe correlação entre os níveis de anexina V e/ou TNF- $\alpha$  e dose de antipsicótico utilizada.

**UP-REGULATION OF ANNEXIN V AND DOWN-REGULATION OF THE TNF- $\alpha$  IN CHRONIC STABLE PATIENTS WITH SCHIZOPHRENIA: ORCHESTRATED DEFENSE FOR NEURONAL DAMAGE?**

Francesconi LP<sup>a,b,c</sup>, Ceresér KM<sup>c,d,e</sup>, Mascarenhas R<sup>a,b</sup>, Stertz L<sup>c</sup>,  
Gama CS<sup>b,c,d,e</sup>, Belmonte-de-Abreu P<sup>a,b,c,d,e</sup>.

<sup>a</sup> *Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil*

<sup>b</sup> *Schizophrenia Program, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil*

<sup>c</sup> *Molecular Psychiatry Unit, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil*

<sup>d</sup> *Programa de Pós-Graduação em Medicina: Psiquiatria, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil*

<sup>e</sup> *INCT Translational Medicine, Porto Alegre, Brazil*

Corresponding author at: Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Laboratório de Psiquiatria Molecular – Rua Ramiro Barcelos, 2350 – Porto Alegre, RS, Brazil, CEP 90035-903.  
E-mail address: le.petter@hotmail.com



## **ABSTRACT**

Apoptotic processes alter the neuronal network and are involved in the pathogenesis of several neurodegenerative diseases, among these, schizophrenia. The high incidence of inflammatory processes is also known in schizophrenic patients. Annexins belong to a family of proteins that bind both calcium and phospholipids, and form calcium-dependent ion voltage channels within the lipid bilayer, regulating fagocytosis, cellular signaling, apoptosis, and leucocytic migration, proteins like phospholipase A2, and several components of inflammation, such as cytokines. Among these, tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ) is a cytokine stimulating systemic inflammation and acute phase reactions. This is the first study evaluating annexin V and TNF- $\alpha$  serum levels in patients diagnosed with schizophrenia and controls. In this study, 38 patients with schizophrenia and 38 controls were included. There was a significant difference in annexin-V and TNF- $\alpha$  levels between patients and controls by Wilcoxon T test ( $p < 0.001$ ). The high levels of annexin V in patients diagnosed with schizophrenia can be responsible for the diminished levels of TNF- $\alpha$  due to its anti-inflammatory action.

**Keywords:** Schizophrenia; annexin V; TNF- $\alpha$ ; inflammation.

## INTRODUCTION

Schizophrenia is a mental disorder characterized by distorted thought perceptions, bizarre deliriums, sensory and perceptive alterations, and inadequate emotional responses, which can eventually lead the patient to a chronic state of deterioration [1,20].

The high incidence of inflammatory processes is also known in schizophrenic patients. Potvin and colleagues (2008) has shown an increased inflammatory process in schizophrenia [23].

Apoptotic processes may alter the neuronal network and are involved in the pathogenesis of several neurodegenerative diseases, such as schizophrenia [15]. Apoptosis is regulated by a complex molecular cascade which controls the activation of the cisteine protease family, known as protein caspase [9]. An alteration in the regulation of the apoptotic cascade a potentially reduce neuronal and glial viability of several developmental stages and could contribute to the volumetric and functional deficit of the brain, observed in schizophrenia [4].

The annexins are water-soluble proteins which contain a hydrophilic surface [8], and are vastly distributed in several organisms, tissues and cellular types. They belong to a family of proteins that bind both calcium and phospholipids. These proteins form calcium-dependent ion voltage channels within the lipid bilayer [22], regulating fagocytosis, cellular signaling, apoptosis, and leucocitic migration, being a cytosolic inhibitory protein of phospholipase A2, and regulating several components of inflammation, such as cytokines [7].

A variety of biochemical, clinical and genetic evidences suggest that phospholipids metabolism would be enrolled in schizophrenia etiology [26].

The role of annexin V during apoptosis was analyzed, and it causes inhibition of pro-coagulation and pro-inflammatory activities. Annexin V seems to have at least a secondary factor in the pathogenesis progress in cells. Until now, the annexins which have been correlated with diseases include annexin V, which regulates inflammation catalyzed by phosphatidylserine and coagulation during apoptosis [25]. Annexin V is a powerful anticoagulant, perhaps because it would interfere in phospholipase A2 membrane tethering [14].

Reutelingsperger and van Heerde [26] consider that annexin V can inhibit several pro-coagulation and pro-inflammatory activities of negatively charged phospholipids that are exposed on the surface membrane through the molecular machinery activated by apoptosis. As long as annexin V is not completely blocked by phagocytosis of damaged cells, it has been suggested that it acts as a selective agent against inflammation and coagulation on damaged sites [25,21].

Tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ) is a cytokine involved in systemic inflammation and is a member of a group of cytokines which stimulate acute phase reactions. TNF- $\alpha$  causes apoptotic cell death, cellular proliferation, differentiation, inflammation, viral replication and tumor progression. TNF- $\alpha$  acts on endothelial cells, activates the expression of new cellular receptors which will in turn promote leukocyte adhesion. It also stimulates endothelial cells to secrete chemokines with chemotaxic action over leukocytes [2].

At the moment, it is impossible to prevent schizophrenia; therefore, the common focus is to treat and rehabilitate the patient. Pharmacotherapeutics has proven to be a key point in treating this disease, and although treatment is rarely curative, antipsychotics have been established as the primary treatment

for all stages of the disease, allowing for a reduction in the hospitalization time and in maintaining the patients for a longer period of time at home [20].

The aim of this study was to evaluate annexin V and TNF- $\alpha$  serum levels in patients diagnosed with schizophrenia and controls. The identification of the role of inflammatory and anti-inflammatory mediators in schizophrenia can lead to targeted interventions to reduce disease progression, apoptosis and handicap associated to the illness.

## **MATERIALS AND METHODS:**

No evidence is found in the current literature which correlates annexin and other clinical parameters in patients diagnosed with schizophrenia. Studies with other markers, such as S-100B and BDNF, evaluated, on average, 30-40 patients and 30-40 controls [27,10]. The study sample consisted of 38 patients diagnosed with schizophrenia from the Hospital de Clínicas de Porto Alegre matched by age and sex. All patients and controls signed an informed consent form.

Diagnosis was given by a trained psychiatrist and according to the SCID-IV and Opcrit 4.0. Disease severity was measured by BPRS (Brief Psychiatric Rating Scale), and illness duration recorded in years. Patients were under public health care at a major teaching hospital (Hospital de Clínicas de Porto Alegre) with a state reference center for schizophrenia.

Controls were selected from blood donors of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Donors with a history of dementia, psychiatric disturbances, drug abuse or use of psychoactive drugs were excluded. Blood collection was carried

out by a trained professional. After blood collection, it was centrifuged at 3000 rpm for 15 minutes, at which point the serum was collected and stored at – 80°C.

Annexin dosing was realized via ELISA utilizing the *Imuclone annexin-V* (American Diagnóstica Inc.) kit; TNF-alpha, was also dosed via ELISA utilizing the ROTNFA021R (BioVendor) kit.

The data was analyzed utilizing the SPSS program, version 16.0. The Kolmogorov-Smirnov test was used to analyze the variable distribution. Since the variables did not follow a normal distribution, we utilized non-parametric tests. To compare two independent events we utilized the Wilcoxon t test, and to verify the association between continued variables we utilized Spearman's correlation. P values below 0.05 were considered significant.

## RESULTS

The sample of patients had a median age of 40 years, with a median of illness duration of 17 years and median of 9.50 years in school.

The following table presents the clinical and demographic characteristics of the samples.

Table 1: Clinical and demographical characteristics

Variable	Total sample		Cases		Controls	
	Median	Interquartile Amplitude	Median	Interquartile Amplitude	Median	Interquartile Amplitude
Age (yrs)	39.0	28.0-46.0	40.0	28.00-46.00	38.0	28.00-46.00
Age at disease onset (yrs)	19.0	17.00-26.00	19.0	17.00-26.00	NA	NA
Disease duration (yrs)	17.00	6.00-23.00	17.0	6.00-23.00	NA	NA
Schooling (yrs in school)	9.50	7.00-11.00	9.50	7.00-11.00	NA	NA
Weight (Kg)	71.65	64.80-89.45	73.85	85.00-99.00	71.65	64.00-85.00
Height (m)	1.66	1.60-1.73	1.68	1.60-1.76	1.67	1.62-1.73
IMC	27.16	23.59-32.18	26.81	24.00-32.90	27.16	23.17-30.91
Variable	N	%	N	%	N	%
<b>Gender</b>						
Female	42	56.8	21	56.8	21	58.1
Male	32	43.2	16	43.2	16	41.9
<b>Hipertension</b>						
Yes	10	14.7	5	15.6	5	13.9
No	58	85.3	27	84.4	31	86.1
<b>Diabetes</b>						
Yes	2	2.9	1	3.1	1	2.7
No	67	97.1	31	96.9	36	97.3

NA = not available

The figure 1 showed that annexin levels are lower than TNF- $\alpha$  and Wilcoxon t test (table 2) showed that there was a significative difference in annexin V and TNF- $\alpha$  levels between patients and controls.

With regards to the antipsychotic medication utilized by the patients, they were, in decreasing order: clozapine (51.4%), risperidone (16.2%), clorpromazine (18.9%), haloperidol (16.2%), sulpiride (10.8%), tioridazine

(2.7%) and pimozide (2.7%), being that some patients used more than one antipsychotic drug.

We did not find an association between annexin e TNF- $\alpha$ , nor with annexin or TNF- $\alpha$  and BPRS ( $p > 0.05$ ).

There was a positive association between TNF- $\alpha$  levels and the equivalent in clorpromazine ( $r_s = 0.356$ ;  $p = 0.036$ ).

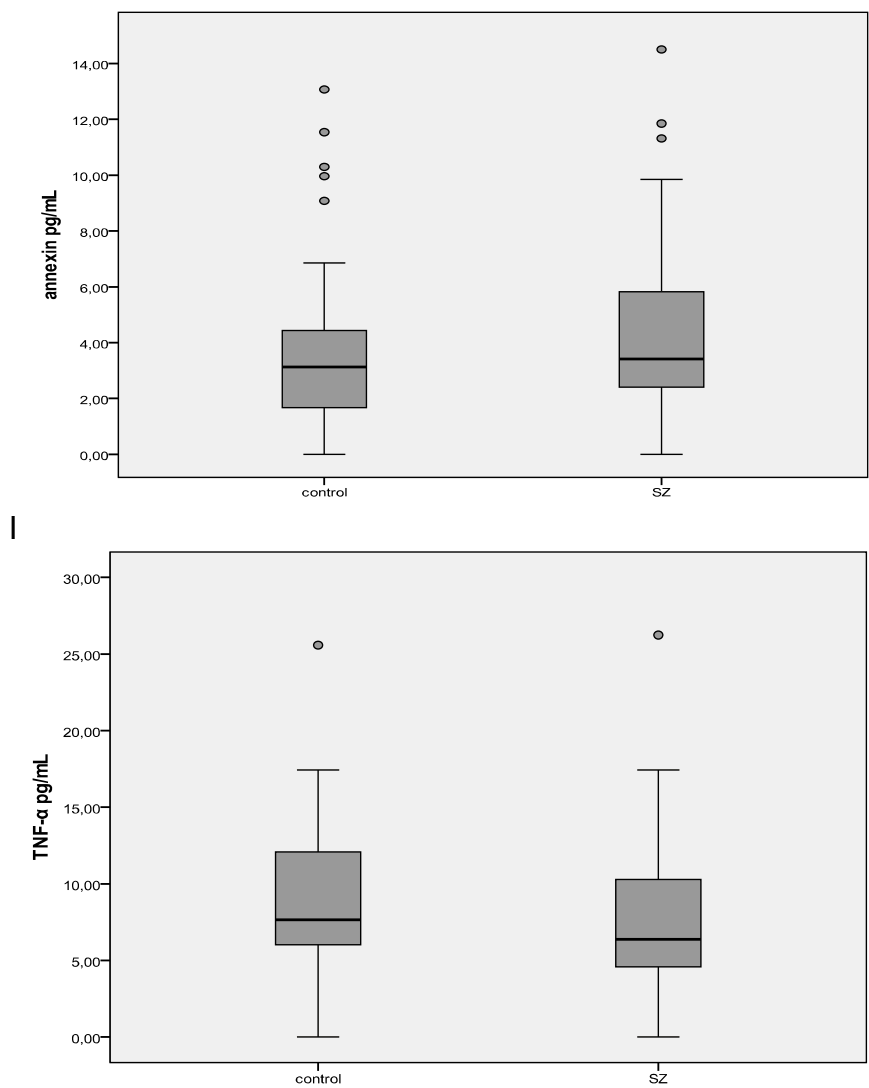


Figure 1: Serum levels of annexin-V and TNF-a in schizophrenic patients and health controls

Table 2: Serum levels of annexin-V and TNF- $\alpha$

Variable – median(interquartile range)	Cases	Controls
Annexin V (pg/mL)*	3.42 (2.40-5.99)	3.13 (1.59-4.99)
TNF- $\alpha$ (pg/mL)*	6.37 (4.51-10.95)	7.64 (5.7-12.20)

\*p < 0.001 (Wilcoxon t test)

## DISCUSSION

The increased levels of annexin in patients diagnosed with schizophrenia compared to normal controls can be responsible for the diminished levels of TNF- $\alpha$  due to its anti-inflammatory action. Besides that, the medication used has a protective effect, further contributing to diminished TNF- $\alpha$  [23,16] levels. The combination of drug effect and annexin V effect can explain the balanced inverse association of annexin and TNF- $\alpha$ , suggesting that stabilized patients under stable drug regimens may be with biological balance through reduced apoptosis.

Altered neuronal functioning in SZ is mediated by changes in membrane fluidity or by alterations in membrane receptors [13], which can cause impairment of neurotransmitter uptake and release, and even cell death. Since significant neurodegenerative processes occur in SZ, and treatment reduces this process, the observed increase of annexin compared to controls may result either as a reaction to illness damage, or effect of illness chronicity. In both cases, the stabilization phase of psychosis may be a period of reduced metabolic brain aggression [10, 30]. In this complex picture, increased levels of annexin in schizophrenia may express compensatory mechanisms to oxidative damage and metabolic stress.



The concept of oxidative stress in psychiatric disorders is intimately linked with the notion of abnormal mitochondrial energy generation [28] in active phases of illness. For example, molecular and genetic studies indicate that disturbances in redox reactions are part of the pathophysiology of schizophrenia [24, 11, 12, 18]. Unfortunately, in vivo measurement of free radical concentrations is impractical because their reactive nature results in short half-lives and low levels [17]. In the addition to relationship of oxidative stress with energy generation, there is also a correlation with dopaminergic and glutamatergic signaling. This last occurs via GSH. GSH can potentiate the activity of redox-sensitive proteins such as NMDA and dopamine receptors [3] and during oxidative stress this is lost. Since it has been suggested that impairments in NMDA receptor activity are associated to schizophrenia, this association could be either due to direct defects in NMDA receptor or secondary deficits due to redox inhibition due to oxidative stress [5,6], and or alteration in peripheral glutamate receptor linkage to second messenger intracellular calcium [31]. The observed differences could be either primary or secondary to glutamate release by activated microglia with increased excitoneurotoxicity and secondary neuronal damage. Additionally, reduced TNF- $\alpha$  secreted from activated microglia could reflect increased neuroprotection [29] secondary to the protective mechanism of the drugs (all patients were on stable medication), in a dose-response fashion, since there was a positive association between TNF- $\alpha$  levels and neuroleptic dose.

This explanation is supported by previous studies (Xavier López-Gil and col.) showing blocked MK-801-induced increase in 5-HT and glutamate by clozapine. Actually, clozapine but not haloperidol effectively blocks the

hyperactivity, metabolic activation, neurotoxic cell damage, as well as the deficits in prepulse inhibition and social interaction induced by NMDA receptor antagonists [19].

There are some limitations in this study: the small sample size and the fact that patients are medicated; moreover, the levels of cortisol could not be measured, which could influence the evaluation of TNF $\alpha$  levels.

Nevertheless, this is the first report detailing a possible effect of TNF- $\alpha$  and annexin levels in schizophrenic patients and it's of interest given the importance of knowledge of the biological bases of psychiatric disorders.

Further studies, particularly prospective ones, are warranted in order to further clarify the findings described in this paper.

## **CONCLUSIONS**

In conclusion, we found differences in TNF- $\alpha$  and annexin-V serum levels among controls and schizophrenic patients.

Lower TNF levels in schizophrenia could reflect neuroprotective effects of antipsychotics, especially clozapine. Additionally, the lack of association between serum annexin V and TNF- $\alpha$  suggests at least partial independence of effect among intracellular annexins, antioxidant enzymes and oxidative markers. This opens a space for research about the role of annexins and treatment in the prevention of neurotoxicity over the course of schizophrenia, and search for additional putative pathways linking annexin-V and TNF- $\alpha$ .

Our findings support the hypothesis of a state dependant process of biomarkers in schizophrenia, which might be related to the known neurodegenerative process, since it possible that these biomarkers can reveal

the disease course and treatment. It also points to the possibility of targeted interventions at the level of these biomarkers as a potential treatment to improve the outcomes of schizophrenia.

## REFERENCES

1. American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, fourth Edition. Washington, DC, 1994.
2. N. Abbas, L.P. Zou, S.H. Pelidou, B. Winblad, J. Zhu. Protective effect of Risperidone in experimental autoimmune neuritis: protection is associated with down-regulation of IFN-gamma and inflammatory chemokines as well as up-regulation of IL-4 in peripheral nervous system. *Autoimmunity*. 2 (2000); 93-99.
3. A.A. Banday M.F. Lokhandwala. Oxidative stress reduces renal dopamine D receptor-Gq/11alpha G protein-phospholipase C signaling involving G protein-coupled receptor kinase 2. *Am J Physiol Renal Physiol*. 293 (2007) 306-315.
4. G.E. Berger, S. Wood, P.D. Mcgorry. Incipient neurovulnerability and neuroprotection in early psychosis. *Psychopharmacol. Bull*. 37 (2003) 79-101.
5. M. Berk, H. Plein, B. Belsham. The specificity of platelet glutamate receptor supersensitivity in psychotic disorders. *Life Sci*. 66 (2000) 2427-2432.
6. M. Berk, H. Plein, T. Csizmadia. Supersensitive platelet glutamate receptors as a possible peripheral marker in schizophrenia. *Int Clin Psychopharmacol*. 14 (1999) 119-122.

7. A.S. Damaso. Análise gênica e protéica da anexina 1 na biologia do desenvolvimento e na fisiopatologia da inflamação. Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina, 2006.
8. H.C. Edwards, M.J. Crumpton. Ca dependent phospholipids and arachidonic acid binding by the placental annexins VI and IV. *Eur. J. Biochem.* 198 (1991) 121-129.
9. R.M. Friedlander. Apoptosis and caspases in neurodegenerative diseases. *N. Engl. J. Med* 348 (2003) 1365-1375.
10. C.S. Gama, A.C. Andreazza, M. Kunz, M. Berk, P.S. Belmonte-de-Abreu, F. Kapczinski. Serum levels of brain-derived neurotrophic factor in patients with schizophrenia and bipolar disorder. *Neurosci Lett.* 420 (2007) 45-48.
11. C.S. Gama, M. Salvador, A.C. Andreazza, F. Kapczinski, P. Silva Belmonte-de-Abreu. Elevated serum superoxide dismutase and thiobarbituric acid reactive substances in schizophrenia: a study of patients treated with haloperidol or clozapine. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 30 (2006) 512-515.
12. C.S. Gama, M. Berk, A.C. Andreazza, F. Kapczinski, P. Belmonte-de-Abreu. Serum levels of brain-derived neurotrophic factor and thiobarbituric acid reactive substances in chronically medicated schizophrenic patients: a positive correlation. *Rev Bras Psiquiatr.* 30 (2008) 337-340.
13. S. Grignon, J.M. Chianetta. Assessment of malondialdehyde levels in schizophrenia: a meta-analysis and some methodological considerations. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 31 (2007) 365-369.

14. R. Huber, R. Berendes, A. Burger, H. Lucked, A. Karshikov. Annexin V-crystal structure and its implications on function. *Behring Inst Mitt.* 91 (1992) 107-25.
15. S.G. Kalinichenko, N.Y. Matveeva. Morphological characteristics of apoptosis and its significance in neurogenesis. *Neurosci Behav Physiol.* 38 (2008) 333-344.
16. T. Kato, A. Monji, S. Hashioka, S. Kanba. Risperidone significantly inhibits interferon-gamma-induced microglial activation in vitro. *Schizophr Res.* 92 (2007) 108-115.
17. M.M. Khan, D.R. Evans, V. Gunna, R.E. Scheffer, V.V. Parikh, S.P. Mahadik. Reduced erythrocyte membrane essential fatty acids and increased lipid peroxides in schizophrenia at the never-medicated first-episode of psychosis and after years of treatment with antipsychotics. *Schizophr Res.* 58 (2002) 1-10.
18. M. Kunz, C.S. Gama, A.C. Andreazza, M. Salvador, K.M. Ceresér, F.A. Gomes, P.S. Belmonte-de-Abreu, M. Berk, F. Kapczinski. Elevated serum superoxide dismutase and thiobarbituric acid reactive substances in different phases of bipolar disorder and in schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 32 (2008) 1677-1681.
19. X. López-Gil, Z. Babot, M. Amargós-Bosch, C. Suñol, F. Artigas, A. Adell. Clozapine and haloperidol differently suppress the MK-801-increased glutamatergic and serotonergic transmission in the medial prefrontal cortex of the rat. *Neuropsychopharmacology.* 32 (2007) 2087-2097.
20. S.R. Marder, J. Mintz, T. Van Putten, M. Lebell, W.C. Wirshing, K. Johnston-Cronk. Early prediction of relapse in schizophrenia: an application

- of receiver operating characteristic (ROC) methods. *Psychopharmacol Bull* 27 (1991) 79-82.
21. A. Mizutani, H. Tokumitsu, R. Kobayashi, H. Hidaka. Phosphorylation of annexin XI (CAP-50) in SR-3Y1 cells. *J Biol Chem.* 268 (1993) 15517-1522.
  22. H.B. Pollard, E. Rojas. Ca<sup>2+</sup>-activated synexin forms highly selective, voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels in phosphatidylserine bilayer membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85 (1988) 2974-2978.
  23. S. Potvin, E. Stip, A.A. Sepehry, A. Gendron, R. Bah and E. Kouassi. Inflammatory Cytokine Alterations in Schizophrenia: A Systematic Quantitative Review. *Biol Psychiatry.* 63 (2008) 801-808.
  24. S. Prabakaran, J.E. Swatton, M.M. Ryan, S.J. Huffaker, J.T. Huang, J.L. Griffin, M. Wayland, T. Freeman, F. Dudbridge, K.S. Lilley, N.A. Karp, S. Hester, D. Tkachev, M.L. Mimmack, R.H. Yolken, M.J. Webster, EF. Torrey, S. Bahn. Mitochondrial dysfunction in schizophrenia: evidence for compromised brain metabolism and oxidative stress. *Mol Psychiatry.* 9 (2004) 684-697.
  25. C.P. Reutelingsperger, W.L. van Heerde. Annexin V, the regulator of phosphatidylserine-catalyzed inflammation and coagulation during apoptosis. *Cell Mol Life Sci.* 53 (1997) 527-532.
  26. B.M. Ross. Phospholipid and eicosanoid signaling disturbances in schizophrenia. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 69 (2003) 407-412.
  27. A. Sarandol , S. Kirli , C. Akkaya , A. Altin , M. Demirci , E. Sarandol. Oxidative-antioxidative systems and their relation with serum S100 B levels

- in patients with schizophrenia: effects of short term antipsychotic treatment. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 31 (2007) 1164-1169.
28. L. Shao, M.V. Martin, S.J. Watson, A. Schatzberg, H. Akil, R.M. Myers, E.G. Jones, W.E. Bunney, M.P. Vawter. Mitochondrial involvement in psychiatric disorders. *Ann Med*. 40 (2008) 281-295. Review.
29. H. Takeuchi, S. Jin, Wang J., G. Zhang, J. Kawanokuchi, R. Kuno, Y. Sonobe, T. Mizuno, A. Suzumura. Tumor necrosis factor-alpha induces neurotoxicity via glutamate release from hemichannels of activated microglia in an autocrine manner. *J Biol Chem*. 281 (2006) 21362-21368.
30. H.E. Vargas, C.S. Gama, A.C. Andreazza, D. Medeiros, L. Stertz, G. Fries, J. Palha, K.M. Ceresér, M. Berk, F. Kapczinski, P.S. Belmonte-de-Abreu. Decreased serum neurotrophin 3 in chronically medicated schizophrenic males. *Neurosci Lett*. 440 (2008) 197-201.
31. S.J. Wood, M. Yücel, C. Pantelis, M. Berk. Neurobiology of schizophrenia spectrum disorders: the role of oxidative stress. *Ann Acad Med Singapore*. 38 (2009) 396-396. Review.

#### 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foram encontradas diferenças entre os níveis séricos de anexina V e TNF- $\alpha$  ( $p < 0,001$ ) entre os controles e pacientes esquizofrênicos. Devido aos efeitos neuroprotetores dos fármacos antipsicóticos, especialmente a clozapina, foram encontrados baixos níveis de TNF- $\alpha$  em pacientes quando comparados com os controles.

A ausência de associação entre os níveis séricos de anexina V e TNF- $\alpha$  ( $p < 0,05$ ) sugere a necessidade de mais pesquisas sobre as interações entre esses biomarcadores. Além disso, abre um espaço para a investigação sobre o papel das anexinas e farmacoterapia na prevenção da neurotoxicidade em pacientes com esquizofrenia.

Nossos resultados apoiam a hipótese de um processo estado-dependente dos biomarcadores na esquizofrenia, o que pode estar relacionado com os processos neurodegenerativos já conhecidos. Estes dados suportam a hipótese de que as intervenções a nível dos biomarcadores podem ser relevantes no tratamento da esquizofrenia.



## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, fourth Edition. Washington, DC, 1994.
2. Berger GE, Wood S, Mcgorry PD. Incipient neurovulnerability and neuroprotection in early psychosis. *Psychopharmacol. Bull.* 2003; 37: 79-101.
3. Damaso AS. Análises gênica e protéica da anexina 1 na biologia do desenvolvimento e na fisiopatologia da inflamação. Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina, 2006.
4. Davis BD. Frontiers of the biological sciences. *Science* 1980;209:78-89.
5. Edwards HC, Crumpton MJ. Ca dependent phospholipids and arachidonic acid binding by the placental annexins VI and IV. *Eur. J. Biochem.* 1991; 198: 121-129.
6. Ernst JD, Mall A, Chew G. Annexins possess functionally distinguishable Ca<sup>2+</sup> and phospholipid binding domains. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 200: 867-876.
7. Friedlander RM. Apoptosis and caspases in neurodegenerative diseases. *N. Engl. J. Med* 2003; 348: 1365-1375.
8. Gama CS, Andreazza AC, Kunz M, Berk M, Belmonte-de-Abreu PS, Kapczinski F. Serum levels of brain-derived neurotrophic factor in patients with schizophrenia and bipolar disorder. *Neurosci Lett.* 2007; 420(1):45-48.
9. Haring C, Fleischhacker WW, Schett P, Humpel C, Barnas C, Saria A. Influence of patient-related variables on clozapine plasma levels. *Am J Psychiatry* 1990;147:1471-1475.
10. Jarskog LF, Glantz LA, Gilmore JH, Lieberman JA. Apoptotic mechanisms in the pathophysiology of schizophrenia. *Prog. Neuro-psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 2005; 29:846-858.

11. Kalinichenko SG, Matveeva NY. Morphological characteristics of apoptosis and its significance in neurogenesis. *Neurosci Behav Physiol.* 2008; 38(4):333-44.
12. Kim SW, Ko J, Kim JH, Choi EC, Na DS. Differential effects of annexins I, II, III and V on cytosolic phospholipase A2 activity: specific interaction model. *FEBS Lett* 2001; 489: 243-248.
13. Kourie JI, Wood HB. Biophysical and molecular properties of annexin-formed channels. *Biophysics and molecular biology* 2000; 73: 91-134.
14. Marder SR, Mintz J, Van Putten T, Lebell M, Wirshing WC, Johnston-Cronk K. Early prediction of relapse in schizophrenia: an application of receiver operating characteristic (ROC) methods. *Psychopharmacol Bull* 1991;27:79-82.
15. Sarandol A, Kirli S, Akkaya C, Altin A, Demirci M, Sarandol E. Oxidative-antioxidative systems and their relation with serum S100 B levels in patients with schizophrenia: effects of short term antipsychotic treatment. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2007; 31(6):1164-9.
16. Stéphane Potvin, Emmanuel Stip, Amir A. Sepehry, Alain Gendron, Ramatoulaye Bah and Edouard Kouassi Inflammatory Cytokine Alterations in Schizophrenia: A Systematic Quantitative Review . *Biol Psychiatry.* 2008; 63(8):801-8.

## **ANEXOS**

### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

#### **TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO PARA PACIENTES**

**Número do estudo:**  
**Data de nascimento:**  
**Médico supervisor:**

**Nome do sujeito:**  
**Cód. de identidade do sujeito:**

Antes de participar deste estudo, gostaríamos que você tomasse conhecimento do que ele envolve. Damos abaixo alguns esclarecimentos sobre dúvidas que você possa ter. Em caso de qualquer dúvida quanto ao estudo, o que ele envolve e sobre os seus direitos, você deverá contatar o Dr. Paulo Silva Belmonte-de-Abreu pelo telefone (51) 9635-3809 (Pesquisador Responsável) ou o Grupo de Pesquisas e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (GPPG-HCPA), 2101-8304.

#### **Qual o objetivo desta pesquisa?**

Conhecer características clínicas dos pacientes e sua possível relação com a anexina (uma substância presente em seu organismo e que pode estar alterada na esquizofrenia) e também se esta substância tem relação com processos inflamatórios. Ou seja, este estudo tem por objetivo, de uma forma geral, conhecer um pouco melhor como “funciona” a esquizofrenia.

#### **Quais os benefícios em participar deste estudo?**

A sua participação neste estudo poderá proporcionar, para você, a identificação de algum problema não antes conhecido, e no âmbito coletivo, poderá ajudar no desenvolvimento de maior conhecimento da esquizofrenia, principalmente em relação às causas da doença e como ela funciona.

#### **Quais são os direitos dos participantes?**

Os pesquisadores deste estudo podem precisar examinar os seus prontuários, para verificar as informações para o objetivo deste estudo. No entanto, os seus prontuários serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados deste estudo poderão ser enviados para publicação em uma revista científica, mas você não será identificado por nome. Sua participação no estudo é voluntária, de forma que caso você decida não participar, isto não afetará o tratamento normal ao qual você tem direito.

#### **Quais são os riscos que envolvem este estudo?**

Esta pesquisa é considerada como de risco mínimo para a saúde, podendo ocorrer uma sensação de dor passageira ou manchas roxas no local da coleta de sangue. Também você vai usar um pouco do seu tempo para responder algumas questões. O sangue coletado será utilizado somente para esta pesquisa.

#### **Quais são as responsabilidades dos participantes?**

Os participantes deste estudo comparecerão às consultas marcadas, bem como responderão às escalas aplicadas pelos médicos pesquisadores e as escalas auto-aplicáveis.

1. Recebi uma explicação completa do objetivo do estudo, dos procedimentos envolvidos e o que se espera de minha pessoa.
2. Estou ciente de que tenho total liberdade de desistir do estudo a qualquer momento e que esta desistência não irá, de forma alguma, afetar meu tratamento ou administração médica futura na instituição.
3. Estou ciente de que a informação nos meus prontuários é essencial para a avaliação dos resultados do estudo. Concordo em liberar esta informação sob o entendimento de que ela será tratada confidencialmente, ou seja, não serei referido por nome em qualquer relatório relacionado a este estudo. Da minha parte, não devo restringir, de forma alguma, o uso dos resultados que possam surgir deste estudo.
4. Concordo total e voluntariamente em fazer parte deste estudo; tenho mais de 18 anos.

Assinatura do Paciente  
Supervisor  
Ass:  
Data:

Assinatura do Médico  
  
Ass:  
Data:

Assinatura do Familiar Responsável pelo Paciente  
Ass:  
Data:

Se você tiver qualquer dúvida poderá ligar para Dr. Paulo Abreu no telefone 96353809 ou GPPG-HCPA, fone 2101-8304..

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA  
CONTROLES:**

Nome:  
Pesquisador:

Número do protocolo:

Esta é uma pesquisa para identificar uma substância chamada anexina, que pode estar alterada no sangue de indivíduos portadores de Esquizofrenia. Nesta pesquisa os voluntários sem a doença (controles) serão convidados a participar através da coleta de uma amostra de sangue e do preenchimento de algumas questões. O sangue coletado será armazenado e essas substâncias serão avaliadas em conjunto com alguns dados coletados de pacientes, sendo utilizado somente para esta pesquisa.

Esta pesquisa é considerada como de risco mínimo para a saúde, podendo ocorrer apenas uma sensação de dor passageira ou manchas roxas no local da coleta de sangue. Também você vai usar um pouco do seu tempo para responder algumas questões.

Seu nome e seus dados serão mantidos em sigilo pelos pesquisadores, sendo estes dados utilizados somente para pesquisa.

Eu,

\_\_\_\_\_, fui informado(a) dos objetivos especificados acima e da justificativa desta pesquisa, de forma clara e detalhada. Recebi informações específicas sobre cada procedimento no qual estarei envolvido, dos desconfortos ou riscos previstos, tanto quanto dos benefícios esperados. Todas as minhas dúvidas foram respondidas com clareza e sei que poderei solicitar novos esclarecimentos a qualquer momento. Além disso, sei que terei liberdade de retirar meu consentimento de participação na pesquisa de acordo com essas informações, sem que isto me traga prejuízos.

Assinatura do voluntário

Assinatura do pesquisador

Local e data

Se você tiver qualquer dúvida poderá ligar para Dr. Paulo Abreu no telefone 96353809 ou GPPG-HCPA, fone 2101-8304.