

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA

**ASSOCIAÇÃO ENTRE O
POLIMORFISMO 2592C>TINS DO GENE
DO RECEPTOR A2A DE ADENOSINA E A
ESQUIZOFRENIA**

GUSTAVO DE LIMA OTTONI

Orientador: Prof. Diogo Rizzato Lara

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas –
Bioquímica, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica

Porto Alegre

2004

AGRADECIMENTOS

Este trabalho não poderia ter sido realizado se algumas pessoas não tivessem contribuído, cada uma a sua maneira, mas todas de forma imprescindível, ao longo de todo o processo. Por isso, tenho muito a agradecer:

Ao meu orientador, Prof. Diogo Lara, por ter idealizado toda a hipótese adenosinérgica da esquizofrenia. Porém, mais importante tem sido o estímulo que passa a mim e a todos que com ele convivem através de seu verdadeiro encantamento com a ciência.

Ao Prof. Maurício Bogo, que acreditou na idéia e propiciou condições teóricas e práticas para que todo o trabalho laboratorial fosse desenvolvido.

Às bolsistas de iniciação científica Inara e Fabíola, que foram companheiras incansáveis desde a seleção de pacientes e coleta do sangue até a etapa laboratorial do trabalho.

Ao colega e amigo Rodrigo pelo auxílio na seleção dos pacientes.

Ao pessoal do Centro de Biologia Genômica e Molecular da PUC-RS, especialmente à Cladinara, pelos ensinamentos e auxílio nas técnicas de laboratório.

A todo o grupo dos Prof. Diogo Souza e Diogo Lara pelos seminários de altíssima qualidade.

Aos professores e funcionários do Curso de Pós-graduação em Bioquímica da UFRGS, por criarem e manterem um ambiente de ensino e pesquisa de alto nível que estimula o pensar, em clima de agradável convivência.

Aos pacientes e familiares, pela participação indispensável. E à AGAFAPE e à Carmem pela cooperação e compreensão da importância da pesquisa científica.

Ao grupo de trabalho da Santa Casa de Porto Alegre, constituído pelos grandes amigos André, Rafael e o já citado Rodrigo, que me apoiaram e entenderam quando não pude estar presente.

Aos meus pais e irmãos pela minha formação pessoal, pelo estímulo e principalmente, pelo grande suporte afetivo sem os quais nada disto seria possível.

À minha noiva Vanessa (a Vá), meu grande amor, por me entender, apoiar e motivar nos momentos de maior dificuldade.

SUMÁRIO

Resumo	8
Abstract	9
Introdução	10
I. Epidemiologia, manifestação clínica e prognóstico da esquizofrenia	10
II. Neuroquímica	12
III. Hipótese da disfunção adenosinérgica na esquizofrenia	15
1. A adenosina e o sistema purinérgico	15
2. A adenosina e a hipótese dopaminérgica da esquizofrenia	19
3. A adenosina e a hipótese glutamatérgica da esquizofrenia	22
4. A adenosina e o sistema GABAérgico	25
5. Déficit inibitório e filtro sensorial	26
6. Antagonistas de receptores de adenosina como um modelo farmacológico da esquizofrenia	28
7. Adenosina e purinas no tratamento da esquizofrenia	30
8. Achados diretos envolvendo a adenosina e o sistema purinérgico na esquizofrenia	33
9. Resumo do modelo da disfunção adenosinérgica na esquizofrenia	33
IV. Genética	35
V. Objetivos do estudo	39

Material e Métodos	40
I. A amostra	40
II. Construção do banco de DNAs (DNAteca)	40
III. Genotipagem	41
IV. Análise estatística	42
Resultados	44
I. Dados demográficos	44
II. Polimorfismo 2592C>Tins	47
III. Polimorfismo 263C>T	55
Discussão	61
Conclusão	68
Referências bibliográficas	69
Anexo	92

LISTA DE ABREVIATURAS

A1R: Receptor adenosinérgico A1;

A2AR: Receptor adenosinérgico A2A;

ADO: Adenosina;

AMP: adenosina monofosfato;

AMPA: Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico;

ATP: Adenosina trifosfato;

CREB: *cAMP-response-element-binding protein*;

D1R: Receptor dopaminérgico D1;

D2R: Receptor dopaminérgico D2;

DARPP-32: Fosfoproteína de massa molecular relativa de 32,000 regulada por dopamina e AMP cíclico;

df: graus de liberdade (*degree of freedom*);

DNA: Ácido desoxirribonucléico;

dNTP: desoxirribonucleosídeo trifosfato;

DP: Desvio padrão;

DSM IV: Manual diagnóstico e estatístico de doenças mentais, 4^a edição;

ECT: Eletroconvulsoterapia;

EEG: Eletroencefalograma;

GABA: Ácido gama-aminobutírico;

HGPRT: Hipoxantina guanina fosforribosiltransferase;

INO: Inosina;

mGLU: receptor glutamatérgico metabotrópico;

MK-801: Dizocilpina;

PCR-RFLP: Polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição de produtos gerados pela reação em cadeia da polimerase;

PET: Tomografia por emissão de pósitrons;

PPI: Inibição pré-pulso;

NMDA: N-metil-D-aspartato;

NTPDases: Nucleosídeos trifosfato difosfohidrolases;

RNAm: Ácido ribonucléico mensageiro;

SCID I: Entrevista clínica estruturada para o DSM IV – transtornos do eixo I;

SHMT: Serina hidroximetil transferase;

Tins: Inserção de base “T”;

TMS: Estimulação eletromagnética transcraniana;

RESUMO

A esquizofrenia é uma doença psiquiátrica grave que afeta aproximadamente 1% da população mundial em que fatores genéticos exercem importante papel na etiopatogenia. Nosso grupo sugeriu a participação do sistema adenosinérgico na fisiopatologia desta doença. Neste estudo genético de associação, uma amostra de 88 pacientes com esquizofrenia foi comparada a um grupo de 100 controles sem histórico pessoal e familiar de doença psiquiátrica, em relação aos polimorfismos 2592C>Tins e 263C>T do gene que codifica o receptor A2A de adenosina. O grupo total de pacientes foi dividido nos seguintes subgrupos: pacientes com predomínio de sintomas positivos, pacientes com sintomas negativos, pacientes com sintomas desorganizados, pacientes com sintomas negativos e desorganizados e pacientes com manifestações mais e menos graves da doença, conforme parâmetro farmacológico. Os grupos de pacientes foram comparados entre si e ao grupo controle em relação aos polimorfismos em estudo. Nossos resultados indicam uma associação do genótipo 2592C/C com a doença, em que variações geneticamente determinadas do nível de expressão dos receptores A2A de adenosina desempenhariam papel no seu desenvolvimento. Particularmente, a sintomatologia negativa e desorganizada, relacionada à proposta da esquizotaxia, esteve associada ao genótipo 2592C/C. Nosso estudo reforça as evidências da participação do sistema adenosinérgico na fisiopatologia da esquizofrenia, mais marcadamente na esquizotaxia, fornecendo evidências genéticas preliminares para esta teoria.

ABSTRACT

Schizophrenia is a severe psychiatric disorder that affects approximately 1% of the world's population in which genetic factors exert an important role in the etiopathogeny. Our group suggested the participation of adenosinergic system in the pathophysiology of this illness. In this genetic study of association, a sample of 88 patients with schizophrenia was compared to a group of 100 controls without personal and familiar history of psychiatric disorders, in relation to 2592C>Tins and 263C>T polymorphisms of the adenosine A2A receptor gene. The whole group of patients was divided in the following sub-groups: patients predominantly with positive symptoms, patients with negative symptoms, patients with disorganized symptoms, patients with negative and disorganized symptoms and patients with more and less serious manifestations of the disorder, according to a pharmacological parameter. Patients were compared among themselves according to the above characteristics and to the controls in relation to the studied polymorphisms. Our results indicate an association of the 2592C/C genotype with the disorder, in which genetically determined variations of the level of adenosine A2A receptors expression would play a role in its development. Particularly the negative and the disorganized symptoms, related with the proposal of schizotaxia, were associated with the 2592C/C genotype. Our study strengthens the evidence for adenosinergic system participation in the pathophysiology of schizophrenia, with more distinction in schizotaxia, supplying preliminary genetic support to this theory.

INTRODUÇÃO

I - Epidemiologia, manifestação clínica e prognóstico da esquizofrenia:

A esquizofrenia é uma doença neuropsiquiátrica grave que atinge aproximadamente 1% da população mundial [Busnello *et al.*, 1993; Murray & Lopez, 1996]. Apresenta taxas de suicídio 20 vezes maiores e expectativa de vida aproximadamente 20% menor que a população em geral [Newman & Bland, 1991] e acarreta um enorme custo social direto (hospitalizações, atendimentos, medicações) e indireto (improdutividade, repercussões familiares), demonstrado pelo fato de no Brasil: ocupar 30% dos leitos psiquiátricos, ou 100 mil leitos/dia; representar o segundo lugar das primeiras consultas psiquiátricas ambulatoriais (14%) e o 5º lugar na manutenção de auxílio-doença [Lara & Abreu, 2000]. Nos EUA a esquizofrenia representa um custo anual de \$40 bilhões de dólares [Carpenter & Buchanan, 1999].

Habitualmente, a esquizofrenia se manifesta durante a adolescência ou início da idade adulta (15-35 anos), com um pico de incidência mais precoce em homens, primeira admissão hospitalar em média aos 25 anos, do que em mulheres, que em média são internadas pela primeira vez aos 30 anos. No entanto, naqueles com história familiar positiva para transtornos psicóticos em parentes de primeiro grau, a manifestação da esquizofrenia é mais precoce e não há diferença entre os sexos quanto à idade de início [Albus *et al.*, 1994]. Sintomas comportamentais sutis e progressivos que determinam dificuldades de adaptação familiar, social e ocupacional, acompanhados por uma maior rigidez afetiva, geralmente precedem o primeiro episódio psicótico, embora um início

abrupto, com sintomas psicóticos proeminentes, possa ocorrer em uma pessoa sem alterações adaptativas prévias [Carpenter & Buchanan, 1999].

Os sintomas característicos da esquizofrenia podem ser divididos em três principais grupos:

- Sintomas positivos: delírios e alucinações;
- Sintomas negativos: embotamento afetivo, avolição, anedonia e alogia;
- Sintomas desorganizados: pensamento e fala desorganizados, comportamento desorganizado ou catatônico e afeto inadequado.

Para se confirmar o diagnóstico, os sintomas devem provocar disfunção social/ocupacional e persistir por um mínimo de 6 meses. Outras doenças psiquiátricas e clínicas que possam causar sintomatologia semelhante, como transtornos do humor, epilepsia, tumores cerebrais, etc, e o uso/efeito de substâncias (drogas de abuso ou medicamentos) devem ser excluídos.

Segundo o Manual Diagnóstico e Estatístico de Doenças Mentais (DSM-IV), 1994, a esquizofrenia é classificada nos seguintes subtipos conforme a manifestação sintomática: paranóide, desorganizada, catatônica, indiferenciada e residual. O curso longitudinal da doença é variado, com melhor prognóstico entre as mulheres [Watt *et al.*, 1983].

A instituição de um tratamento farmacológico adequado melhora significativamente a sintomatologia de aproximadamente 70% dos pacientes [Lara & Abreu, 2000]. A sintomatologia positiva tem melhora mais marcada, enquanto a negativa mostra-se mais resistente aos fármacos atualmente disponíveis.

O prejuízo no ajustamento social serve como bom parâmetro para se avaliar o prognóstico na esquizofrenia. Entre os portadores, 1/3 apresentam bom funcionamento social, 1/3 funcionamento intermediário e o último 1/3 desenvolvem incapacitação social grave [De Jong *et al.*, 1985; Shepherd *et al.*, 1989]. O prejuízo social é progressivo, iniciando pelos contatos sociais periféricos até atingir as áreas internas do funcionamento, como o cuidado pessoal [De Jong *et al.*, 1985].

O tratamento farmacológico disponível atualmente se restringe a poucos sintomas e com eficácia moderada, ou seja, mesmo os pacientes que respondem ao tratamento persistem com sintomas residuais que prejudicam consideravelmente seu bem estar e qualidade de vida, além de freqüentemente representarem um peso para a família. Como os modelos clássicos para a esquizofrenia parecem ter chegado ao seu limite do ponto de vista terapêutico, o estudo de novos modelos fisiopatológicos deve contribuir para a compreensão da doença e para o desenvolvimento de tratamentos mais eficientes. É provável que o conhecimento das alterações genéticas relacionadas à esquizofrenia possam nortear tratamentos mais eficazes em relação aos sintomas e ao curso da doença.

II – Neuroquímica:

As teorias neuroquímicas para a esquizofrenia baseiam-se em alterações em sistemas de neurotransmissores, estando os principais achados relacionados à dopamina e ao glutamato.

O sistema dopaminérgico pode estar envolvido na fisiopatologia da esquizofrenia, pois o bloqueio dos receptores D2 de dopamina (D2R) é o mecanismo pelo qual agem os antipsicóticos. Também a evidência de que a exposição sustentada à

anfetamina, a qual aumenta a liberação dopaminérgica, pode produzir sintomas psicóticos [Laruelle & Abi-Dargham, 1999], reforça esta teoria. Estudos com tomografia por emissão de pósitron (PET) demonstraram aumento do *turnover* de dopamina [Lindstrom *et al.*, 1999], aumento da liberação de dopamina induzida por anfetamina [Laruelle & Abi-Dargham, 1999], assim como elevada ocupação basal dos D2R por dopamina em pacientes esquizofrênicos. Com isto, torna-se razoável supor que um estado hiperdopaminérgico esteja presente em muitos pacientes, ao menos nos períodos de exacerbação sintomática [Laruelle, 2000]. Entretanto, a dopamina parece não responder pela síndrome completa e pelos sintomas em cerca de 1/3 dos pacientes (baseado em resposta clínica a antagonistas D2 e em estudos com PET).

O glutamato, principal neurotransmissor excitatório no sistema nervoso central (SNC), atua em receptores ionotrópicos (NMDA, AMPA e kainato) e metabotrópicos (mGlu) [Olney & Farber, 1995; Krystal *et al.*, 2002]. Além de seu papel bem documentado em vários processos fisiológicos, como aprendizado e memória, a hiperativação do sistema glutamatérgico provoca excitotoxicidade, que se presume fazer parte de condições neurodegenerativas e isquêmicas [Olney & Farber, 1995]. Relacionado à esquizofrenia, antagonistas dos receptores NMDA (fenciclidina, quetamina e MK-801) são capazes de produzir tanto sintomas positivos quanto negativos e cognitivos da doença, ao invés de causar apenas sintomas positivos como a anfetamina [Olney & Farber, 1995; Krystal *et al.*, 2002]. No entanto, os antagonistas NMDA raramente produzem alucinações auditivas e podem causar bradicinesia e um estado dissociativo distinto da esquizofrenia [Krystal *et al.*, 2002]. Relacionado a tratamento, Heresco-Levy *et al.*, 1999, encontraram que a associação de glicina, que estimula a

atividade do receptor NMDA, ao tratamento, reduziu os sintomas negativos sem afetar os positivos. A hipótese de disfunção NMDA, como proposta por Olney & Farber, 1995, ainda oferece uma explicação neuroquímica para a idade de início da doença, já que a suscetibilidade aos efeitos neurotóxicos dos antagonistas NMDA começa na puberdade, aumentando gradualmente até a idade adulta, tanto em ratos como em humanos. Por isso, o anestésico quetamina induz sintomas tipo esquizofrenia em adultos, mas não em crianças [Olney & Farber, 1995].

Moghaddam *et al.*, 1997, detectaram que antagonistas NMDA também estimulam a liberação de glutamato, o que levaria a uma hiper-estimulação de outros subtipos de receptores deste neurotransmissor. De acordo com isto, os antagonistas de receptores não-NMDA inibem a hiperlocomoção e a neurotoxicidade induzida por antagonistas NMDA [Hauber & Andersen, 1993; Olney & Farber, 1995], e um agonista de receptor mGlu (subtipos II/III), que inibe a liberação de glutamato, reverteu os efeitos locomotores e cognitivos da fenciclidina sem afetar a aumentada liberação de dopamina [Moghaddam & Adams, 1998]. Em humanos, a lamotrigina, que também inibe a liberação de glutamato, atenuou os efeitos neuropsiquiátricos da quetamina em voluntários normais [Anand *et al.*, 2000] e a alteração do PPI (inibição pré-pulso como parâmetro de filtro sensorial) em camundongos [Brody *et al.*, 2003]. A lamotrigina também apresentou boa resposta em esquizofrênicos refratários à clozapina como tratamento adjunto [Dursun & Deakin, 2001]. Muitos efeitos dos antagonistas NMDA estão possivelmente relacionados ao aumento da liberação de glutamato, o que aumentaria a atividade dos receptores não-NMDA. Estes achados estão de acordo com um estudo prévio indicando atividade glutamatérgica aumentada em esquizofrenia [Deakin *et al.*, 1989]. Entretanto, Adams &

Moghaddam, 1998, alertaram que o período de aumento da locomoção pela fenciclidina em ratos era temporalmente dissociado do aumento dos níveis de dopamina e glutamato.

Um déficit inibitório em pacientes com esquizofrenia tem sido demonstrado em diferentes protocolos, sendo normalmente atribuído a uma atividade GABAérgica reduzida. Há evidências sugestivas de um reduzido número de interneurônios, de reduzidos marcadores de atividade GABAérgica e de uma expressão aumentada de receptores GABA-A no cérebro de portadores de esquizofrenia [Benes & Berretta, 2001]. Entretanto, um recente trabalho fracassou em encontrar diferenças significativas de ácido glutâmico descarboxilase 65 e 67 RNAm positivos no hipocampo de esquizofrênicos [Heckers *et al.*, 2002].

Baseados na atividade neuromoduladora da adenosina, Lara & Souza, 2000, desenvolveram hipótese sugerindo que muitos aspectos da esquizofrenia seriam consistentes com um déficit na atividade adenosinérgica e alterações no sistema purinérgico.

III - Hipótese da disfunção adenosinérgica na esquizofrenia:

1) A adenosina e o sistema purinérgico:

O sistema purinérgico compreende dois efetores principais, o neuromodulador adenosina, atuando nos receptores A1, A2A, A2B e A3, e o nucleotídeo ATP, que atua nos receptores P2X e P2Y [Ralevic & Burnstock, 1998]. No sistema nervoso central (SNC) humano, os receptores A1 (A1R) são densa e heterogeneamente expressos, sendo particularmente abundantes no córtex temporal, frontal, parietal e occipital, no cíngulo, no hipocampo, nos gânglios basais e no tálamo mediodorsal, e menos concentrados no

córtex sensório-motor e insular, no tálamo lateral, no cerebelo, no mesencéfalo e no tronco cerebral [Bauer *et al.*, 2003]. Os receptores adenosinérgicos A2A (A2AR) são predominantemente encontrados no estriado, co-localizados com os receptores D2 (D2R) de dopamina [Ferre, 1997], mas expressões mais baixas podem ser encontradas em outras regiões cerebrais. Os papéis dos receptores A2B e A3 são menos estabelecidos. Esses podem ser ativados apenas em condições patológicas, quando os níveis de adenosina aumentam significativamente, pois têm baixa afinidade pela adenosina [Dunwiddie & Masino, 2001].

Como demonstrado na figura 1, após o ATP ser liberado na fenda sináptica pelas vesículas pré-sinápticas, ecto-nucleotidases como as ecto-NTPDases e a ecto-5'-nucleotidase promovem sua hidrólise até adenosina, integrando ambos o sistema purinérgico [Zimmermann, 1996]. Depois, a adenosina pode ser captada por transportadores de nucleosídeos, unidirecional (concentração) ou bidirecionalmente (equilíbrio). Os últimos também liberam a adenosina quando sua concentração intracelular está aumentada, como na hipóxia cerebral. O AMP cíclico é outra fonte de adenosina que pode ser utilizada menos rapidamente que a partir da quebra extracelular de ATP ou liberação de adenosina e pode ser mais relevante como fonte de adenosina no núcleo acumbens [Dunwiddie & Masino, 2001]. Posteriormente, a adenosina pode ser metabolizada a inosina, hipoxantina, xantina e finalmente, a ácido úrico (figura 2), ou pode ser fosforilada pela adenosina quinase (figura 1), a qual é sua rota preferencial sob condições fisiológicas [Dunwiddie & Masino, 2001]. Uma vez que os níveis de adenosina são ~10,000 vezes menores que os de ATP, um mínimo aumento na quebra de ATP pode

O A1R está entre os mais abundantes e amplamente expressos receptores inibitórios ligados à proteína G no cérebro [Rivkees *et al.*, 1995]. Sua ativação inibe a liberação de vários neurotransmissores, como glutamato, dopamina, serotonina e acetilcolina e diminui a atividade neuronal através de hiperpolarização pós-sináptica [Dunwiddie & Masino, 2001]. Essa ação neuromodulatória sob condições fisiológicas pode ser diferenciada do papel da adenosina como um regulador homeostático da atividade cerebral em condições de estresse ou fisiopatológicas [Cunha, 2001], quando a adenosina formada a partir da quebra intracelular de ATP é liberada para inibir a atividade neuronal excitotóxica do glutamato. Por esta razão, a adenosina é considerada um agente anticonvulsivante e neuroprotetor endógeno. De acordo com isso, estudos pré-clínicos demonstram que a administração de agonistas A1R exerce ação anticonvulsivante, neuroprotetora, ansiolítica, sedativa [Ralevic & Burnstock, 1998; Dunwiddie & Masino, 2001], antiagressiva [Ushijima *et al.*, 1984] e ação antipsicótico-like [Kafka & Corbett, 1996; Ferre, 1997; Sills *et al.*, 1999]. Camundongos *knockout* para o A1R apresentam agressividade, ansiedade, instabilidade emocional, aprendizagem normal, aumentada suscetibilidade a hipóxia na idade adulta e menores taxas de sobrevivência [Johansson *et al.*, 2001; Lang *et al.*, 2003].

Os receptores A2A e D2 são co-localizados nos neurônios GABAérgicos estriadopalidais e formam complexos heteroméricos funcionais, com ações opostas [Ferre, 1997; Hillion *et al.*, 2002]. A ativação dos A2AR diminui a afinidade dos D2R pela dopamina, sem alterar sua afinidade por antagonistas do D2. Ambos os receptores têm efeitos antagonistas sobre o acúmulo de AMPc, regulação da DARPP-32, fosforilação do CREB e expressão de *c-fos* [Svenningsson & Fredholm, 2003]. Pré-

cl clinicamente, os agonistas A2AR exercem efeitos semelhantes aos dos antipsicóticos e cataléptico, enquanto os antagonistas aumentam a locomoção e têm ação antiparkinsoniana [Ferre, 1997]. Camundongos *knockout* para o A2AR apresentam agressividade aumentada, ansiedade e hipoalgesia [Ledent *et al.*, 1997], além de demonstrarem redução dos efeitos comportamentais após a administração de anfetamina e cocaína [Chen *et al.*, 2000].

O efeito potencializador de um agonista A1R sobre a expressão mediada por A2AR de *c-fos* no estriado [Karcz-Kubicha *et al.*, 2003], demonstra a interação entre os receptores A1 e A2A de adenosina. Em outras palavras, a ativação do A1R promove a ação do A2AR e sua ação conjunta diminui mais intensamente a expressão de *c-fos* no estriado do que quando agem separadamente. Adicionalmente, um antagonista seletivo de A2AR inibe o efeito de um agonista A1R, reforçando sua interação ao menos no estriado.

2) A adenosina e a hipótese dopaminérgica da esquizofrenia:

A regulação da atividade dopaminérgica pela adenosina envolve os receptores A1 e A2A, tanto na pré quanto na pós-sinapse. O A1R pré-sináptico modula a liberação de dopamina no estriado: antagonistas A1R aumentam, enquanto agonistas A1R inibem a liberação de dopamina [Okada *et al.*, 1996; Solinas *et al.*, 2002; Quarta *et al.*, 2004]. Especificamente, a ativação de A1R inibe a liberação de dopamina induzida por metanfetamina [Golembiowska & Zylewska, 1998]. Os A2AR são co-localizados com os D2R e reduzem sua afinidade por dopamina em ratos e humanos [Ferre, 1997; Diaz-Cabiale *et al.*, 2001]. Estes mecanismos provavelmente contribuam para: (1) o perfil semelhante a antipsicótico dos agonistas dos receptores de adenosina [Kafka & Corbett, 1996; Ferre, 1997; Rimondini *et al.*, 1998]; (2) a exacerbação induzida pela cafeína dos

sintomas psicóticos em pacientes com esquizofrenia [Lucas *et al.*, 1990]; (3) a semelhança da estimulação produzida pela cafeína com a induzida por anfetamina; (4) a reversão por antipsicóticos dos efeitos comportamentais induzidos pela cafeína [Ferre, 1997; Powell *et al.*, 2001]. Vale mencionar que a modulação do sistema dopaminérgico pela adenosina é mais pronunciada nas vias mesolímbicas do que nas nigroestriatais [Stoner *et al.*, 1988; Kafka & Corbett, 1996; Ferre, 1997; Karcz-Kubicha *et al.*, 2003], o que é coerente com os achados em esquizofrenia. Isso poderia ser relacionado com: i) o aumento seletivo da liberação de dopamina e glutamato pela cafeína e um antagonista A1R na superfície (relacionada com vias mesolímbicas), mas não no centro (relacionado com vias nigroestriatais) do núcleo acumbens [Solinas *et al.*, 2002] e ii) a interação pós-sináptica dos receptores A2A-D2, a qual é possivelmente mais proeminente onde a concentração de dopamina extracelular é menor [Pinna *et al.*, 1997], como o estriado ventral comparado com o dorsal [Seeman & Talerico, 1998]. De acordo, a cafeína e os antagonistas seletivos de receptores de adenosina induzem locomoção [Manzoni *et al.*, 1998], mas não estereotípias (relacionadas ao nigroestriado), em contraste com o efeito da anfetamina em produzir estes dois comportamentos.

Achados envolvendo o sistema dopaminérgico em esquizofrenia são compatíveis com um déficit de adenosina. Na pré-sinapse, o *turnover* aumentado de dopamina [Lindstrom *et al.*, 1999] e o aumento da liberação de dopamina induzido por anfetamina em esquizofrênicos [Laruelle, 2000] estão de acordo com o efeito inibitório de um agonista A1R na liberação de dopamina induzida por metanfetamina [Golembiowska & Zylewska, 1998] e com a potencialização por antagonistas A1R da locomoção induzida por anfetamina [Popoli *et al.*, 1994] e da liberação de dopamina no núcleo acumbens

[Solinas *et al.*, 2002]. A elevada ocupação basal de D2R pela dopamina em pacientes com esquizofrenia [Abi-Dargham *et al.*, 2000] pode estar relacionada a uma diminuição do efeito do A2AR sobre o D2R, levando a um aumento da afinidade dos D2R à dopamina [Ferre *et al.*, 1991]. Interessantemente, em situações de pouca atividade dopaminérgica, como no estudo de Abi-Dargham *et al.*, 2000, o efeito regulatório dos A2AR na expressão de *c-fos* pode ser mais explicitamente observada [Pinna *et al.*, 1997]. Além disso, a afinidade inalterada dos D2R em pacientes com esquizofrenia, evidenciado em um estudo com PET, utilizando um antagonista dopaminérgico para deslocar o radioligante [Farde *et al.*, 1990], é consistente com o fato de a adenosina somente alterar a afinidade dos receptores de dopamina para agonistas, e não para antagonistas [Ferre *et al.*, 1991].

Um processo de sensibilização neuroquímica, similar àquele induzido por tratamento repetitivo com estimulantes dopaminérgicos, tem sido sugerido para a fisiopatologia da esquizofrenia [Lieberman *et al.*, 1997; Laruelle, 2000]. Neste sentido, deveria ser considerado que o tratamento com cocaína, também um modelo de psicose, reduz a sensibilidade das vias dopaminérgicas mesolímbicas à ação inibitória da adenosina mediada por A1R [Manzoni *et al.*, 1998; Toda *et al.*, 2003], com resposta inalterada à própria dopamina e a agonistas de receptores metabotrópicos do glutamato. Esse efeito parece relacionado a um aumento da captação de adenosina [Manzoni *et al.*, 1998] ou a uma redução na externalização de A1R [Toda *et al.*, 2003], o que reduziria a ação adenosinérgica nestas vias. Esta hipofunção da adenosina, possivelmente contribuiria para a aumentada sensibilização dopaminérgica proposta para a esquizofrenia [Laruelle, 2000], uma vez que nestas vias este neuromodulador inibe tanto a atividade

dopaminérgica quanto a glutamatérgica [Fredholm *et al.*, 1999]. De acordo, um agonista A1R inibiu a expressão da sensibilização induzida por metanfetamina [Shimazoe *et al.*, 2000] e o bloqueio A1R preveniu a extinção do comportamento de busca da cocaína em camundongos [Kuzmin *et al.*, 1999]. Considerando a influência dos A1R sobre os A2AR, uma alteração primária da atividade relacionada a A1R poderia determinar um déficit secundário da função de A2AR.

Uma disfunção relacionada à adenosina poderia ainda ser um fator comum responsável pela correlação encontrada entre atividade frontal reduzida (devido a conectividade alterada) e função dopaminérgica estriatal elevada (devido a uma reduzida inibição adenosinérgica na atividade dopaminérgica) na esquizofrenia [Meyer-Lindenberg *et al.*, 2002]. Interessantemente, a inibição da atividade do núcleo acumbens pela adenosina, via A1R, foi demonstrada ser local, mas é aumentada quando são removidos os mecanismos corticais de controle [Buckby & Lacey, 2001].

Uma expressão aumentada de D1R no córtex préfrontal foi descrita com tratamento crônico com cafeína [Powell *et al.*, 2001] assim como em esquizofrênicos comparados a seus respectivos controles em um recente estudo com PET [Abi-Dargham *et al.*, 2002] e em um estudo *post-mortem* [Domyo *et al.*, 2001]. Em resumo, a hipofunção adenosinérgica é compatível tanto com alterações pré quanto pós-sinápticas do sistema dopaminérgico na esquizofrenia.

3) A adenosina e a hipótese glutamatérgica da esquizofrenia:

A adenosina está bem caracterizada como um modulador endógeno da atividade glutamatérgica, inibindo a liberação de glutamato e também a ação pós-sináptica de neurotransmissores excitatórios através da hiperpolarização neuronal via A1R

[Dunwiddie & Masino, 2001]. Em modelos animais de esquizofrenia, tem sido repetidamente demonstrado que agonistas A1R e A2AR previnem alterações comportamentais e neurofisiológicas (EEG e inibição pré-pulso) induzidas por antagonistas NMDA [Browne & Welch, 1982; Kafka & Corbett, 1996; Popoli *et al.*, 1997; Rimondini *et al.*, 1997; Sills *et al.*, 1999], indicando um potencial efeito antipsicótico em humanos. Para se analisar o paradoxo de agonistas A1R inibirem as ações tanto de antagonistas de receptores NMDA quanto do glutamato, deve-se considerar a evidência de que antagonistas NMDA também provocam aumento da liberação de glutamato. Assim como agonistas dos receptores mGlu II/III e a lamotrigina [Moghaddam & Adams, 1998; Anand *et al.*, 2000], agonistas A1R provavelmente revertam os efeitos dos antagonistas dos receptores NMDA através da inibição da liberação de glutamato. É importante mencionar que a ativação de receptores NMDA promove a liberação de adenosina no estriado e no hipocampo [Craig & White, 1993; Manzoni *et al.*, 1994; Melani *et al.*, 1999], mas o efeito dos antagonistas do receptor NMDA na liberação de adenosina basal, em doses que aumentam a locomoção, ainda está por ser determinado. Recentemente, foi demonstrado que o tratamento crônico com cafeína, que produz tolerância a seus próprios efeitos locomotores, provocou tolerância cruzada quase completa para a estimulação induzida pelo MK-801 em camundongos, sem alterar o comportamento exploratório normal [Dall'Igna *et al.*, 2003]. Este efeito é dose e tempo dependente e inclui alterações cognitivas, mas não ataxia quando a mínima dose efetiva de MK-801 é usada em cada tarefa (observações não publicadas). Em outras palavras, em camundongos adaptados a funcionar com um menor tônus adenosinérgico [Dall'Igna *et al.*, 2003], o antagonismo de receptores NMDA produz menos efeitos

comportamentais. Interessantemente, a liberação de dopamina e de glutamato induzida por um antagonista A1R no núcleo acumbens foi abolida após o tratamento crônico com cafeína em ratos [Quarta *et al.*, 2004], o que pode estar relacionado com a tolerância cruzada em relação ao comportamento entre a cafeína e o MK-801. Embora altamente especulativa, uma comparação entre o efeito locomotor da fenciclidina [Adams & Moghaddam, 1998] e o efeito de um antagonista A1R na liberação de dopamina no núcleo acumbens [Quarta *et al.*, 2004] permite uma robusta correlação ($r=0.99$ – ambos os estudos foram conduzidos em ratos adultos masculinos Sprague-Dawley).

Finalmente, um recente estudo demonstrou que a ativação de A1R preveniu completamente a neurotoxicidade, o aumento da expressão de *c-fos* e a liberação de acetilcolina induzida por um antagonista de receptor NMDA em ratos [Okamura *et al.*, 2004]. Baseados nestes achados, propomos que o modelo de hipofunção NMDA também produz hipofunção adenosinérgica, provavelmente por provocar redução na liberação de adenosina e prejuízo da atividade de A1R, e este mecanismo pode contribuir para muitos efeitos dos antagonistas de receptores NMDA. Desta forma, a adenosina pode ser uma ligação entre as hipóteses glutamatérgica e dopaminérgica da esquizofrenia, por exemplo, mediando o efeito estimulante da quetamina sobre a liberação de dopamina induzida por anfetamina em voluntários normais [Kegeles *et al.*, 2000].

Krystal *et al.*, 2002, pontuaram que antagonistas do receptor NMDA preferencialmente inibem a atividade de interneurônios inibitórios no hipocampo, levando à hiperexcitabilidade dos neurônios piramidais. De acordo, Olney & Farber, 1995, sugeriram que a atividade prejudicada dos interneurônios inibitórios estimulada por receptores NMDA seria equivalente ao estado produzido pelo bloqueio dos receptores

NMDA. Manzoni *et al.*, 1994, demonstraram que a aplicação de NMDA no hipocampo produziu uma inibição sináptica mediada mais por adenosina do que por GABA ou óxido nítrico, provavelmente a partir de interneurônios inibitórios. Este estudo confirma achados prévios sobre a liberação de adenosina estimulada por NMDA [Chen *et al.*, 1992; Craig & White, 1993]. Associado a estes resultados, a administração de baixas doses de NMDA reduz de maneira reversível a locomoção por teofilina e por um antagonista de A1R, mas não por anfetamina [Von Lubitz *et al.*, 1993; Gimenez-Llort *et al.*, 1995], e aumenta a liberação de adenosina no estriado *in vivo* [Melani *et al.*, 1999]. Estes efeitos da estimulação de receptores NMDA sobre a liberação de adenosina podem também estar relacionados ao efeito terapêutico do co-agonista NMDA glicina em pacientes com esquizofrenia [Heresco-Levy *et al.*, 1999].

4) A adenosina e o sistema GABAérgico:

Como anteriormente referido, um déficit inibitório em pacientes com esquizofrenia tem sido demonstrado em diferentes protocolos, sendo normalmente atribuído a uma atividade GABAérgica reduzida. Entretanto, a adenosina também pode estar relacionada a este déficit inibitório. Apesar de opinião contrária [Wassef *et al.*, 1999], as várias drogas GABAérgicas (benzodiazepínicos, barbitúricos, valproato, baclofen) testadas em esquizofrenia, em sua maioria não apresentaram resposta satisfatória para a sintomatologia nuclear da doença [Hesslinger *et al.*, 1999] ou apenas foram eficazes para ansiedade e agitação psicomotora [Winterer & Hermann, 2000], por isso, não são consideradas um tratamento efetivo para a esquizofrenia na prática clínica atual. Se a proposta redução do tônus GABAérgico fosse uma alteração primária, levando à expressão aumentada dos receptores GABA-A na esquizofrenia [Benes & Berretta,

2001], os pacientes deveriam responder e ser particularmente sensíveis ao tratamento com agonistas GABAérgicos, o que não parece ocorrer [Lara, 2002]. Uma interpretação alternativa seria a de que o sistema GABAérgico é assim regulado como uma resposta compensatória à falta de tônus inibitório de outra natureza, como por exemplo, um déficit adenosinérgico. O aumento de receptores GABAérgicos em ratos cronicamente tratados com cafeína está de acordo com essa hipótese [Shi *et al.*, 1993]. A ação anticonvulsivante endógena da adenosina também poderia estar associada com a elevada comorbidade entre esquizofrenia e epilepsia [Makikyro *et al.*, 1998].

5) Déficit inibitório e filtro sensorial:

A adenosina também tem demonstrado influenciar respostas neuropsicológicas de filtro sensorial classicamente alteradas na esquizofrenia, como o potencial evocado P50 e a inibição pré-pulso [Lara, 2002], que estão relacionados à habilidade de se filtrar estímulos irrelevantes.

Déficits no filtro sensorial em pacientes com esquizofrenia sugerem deficiência da atividade inibitória cerebral [Adler *et al.*, 1998]. No paradigma da supressão do P50, quando dois estímulos auditivos são apresentados com diferença de 500 ms, a amplitude da segunda resposta [Kurumaji & Toru, 1998], comparada com a da primeira (S1), é marcadamente atenuada nos sujeitos sadios [Adler *et al.*, 1998]. Recentemente, foi observado que o antagonista adenosinérgico teofilina (6.6 mg/kg) prejudicou a mensuração do filtro sensorial com o paradigma do P50 em voluntários sadios, assemelhando-se aos achados nos esquizofrênicos [Ghisolfi *et al.*, 2002]. O tratamento com teofilina aumentou significativamente a razão do P50 (S2/S1) de 0.28 na linha de base para 0.82, o qual não foi significativamente diferente do grupo com esquizofrenia

(0.74). Esta característica inibição atividade-dependente do paradigma do P50 é compatível com as ações inibitórias de curta duração da adenosina relatadas sobre estimulação repetida em níveis fisiológicos no hipocampo [Mitchell *et al.*, 1993], uma região modulatória fundamental para o desenvolvimento da resposta inibitória do P50 [Adler *et al.*, 1998; Ghisolfi *et al.*, 2002]. Foi conduzido um experimento similar com cafeína (0, 100, 200 e 400 mg) em voluntários normais, que demonstrou efeito mais marcado com 200mg [Ghisolfi *et al.*, 2002]. Interessantemente, a razão basal do P50 é significativamente mais alta em usuários regulares de cafeína, que é a resposta que reflete inibição determinada por estímulo condicionado. Isso sugere que o tônus inibitório basal pode estar relacionado à ingestão espontânea de cafeína.

Na inibição pré-pulso (PPI), que é principalmente regulada por vias dopaminérgicas mesolímbicas, um estímulo suave apresentado imediatamente antes de um estímulo alarmante atenua a resposta ao último. Embora não esteja demonstrado que antagonistas adenosinérgicos provoquem alteração da inibição pré-pulso por si só, a administração combinada de teofilina e do agonista dopaminérgico apomorfina, em doses desprovidas de efeitos significativos individualmente, reduziu significativamente o PPI [Koch & Hauber, 1998]. Além disso, camundongos *knockout* para A2AR apresentam PPI reduzido e habituação ao alarme [Wang *et al.*, 2003]. Analisados em conjunto, estes resultados sugerem um papel modulatório da adenosina no filtro sensorial normal e, possivelmente, nas alterações em pacientes com esquizofrenia. Em um sentido mais amplo, o prejuízo da neuromodulação inibitória da adenosina pode levar a uma disfunção sináptica generalizada, afetando a ação de vários neurotransmissores. Considerando-se que a ação neuromodulatória da adenosina através de A1R é predominantemente pré-

sináptica, isso também é consistente com propostas recentes de disfunção pré-sináptica e neuromodulação alterada em esquizofrenia [Frankle *et al.*, 2003].

6) Antagonistas de receptores de adenosina como um modelo farmacológico da esquizofrenia:

Se um reduzido tônus adenosinérgico estiver presente na esquizofrenia, é esperado que os antagonistas da adenosina reproduzam certos achados da doença (tabela 1). A cafeína e a teofilina ou antagonistas seletivos A1R, como modelos farmacológicos da esquizofrenia, produzem hipofunção adenosinérgica transitória e, por isso, não é esperado que reflitam as alterações resultantes da perda cerebral devido a déficit inibitório prolongado. Do mesmo modo, para psicoses há a evidência de que uma alteração neuroquímica duradoura desencadearia sintomas positivos [Kapur, 2003] e a ruptura repetitiva e transitória deste estado (p.ex. com a quetiapina) é efetiva como tratamento antipsicótico [Kapur *et al.*, 2000].

Semelhantemente à anfetamina e aos antagonistas do receptor NMDA, a cafeína e a teofilina provocam hiperlocomoção em roedores, o que é revertido por antipsicóticos [Ferre, 1997]. Importa salientar que o efeito da cafeína sobre a dopamina, em contraste ao da anfetamina, é seletivo para vias dopaminérgicas do sistema límbico [Stoner *et al.*, 1988; Solinas *et al.*, 2002], provendo um modelo mais específico para o estado hiperdopaminérgico da esquizofrenia. Em humanos, altas doses de antagonistas de adenosina podem produzir psicose [McManamy & Schube, 1936; Mansheim, 1989; Mackay & Rollins, 1989; Hughes *et al.*, 1998] e outros sintomas comumente observados na esquizofrenia, como ansiedade, inquietude e insônia, além de piorar a psicose e os

sintomas cognitivos em pacientes com a doença [Mikkelsen, 1978; De Freitas & Schwartz, 1979; Lucas *et al.*, 1990].

Relacionado a déficits neuropsicológicos, altas doses de cafeína determinam uma performance prejudicada no *Stroop task* em voluntários saudáveis [Foreman *et al.*, 1989], achado replicado em esquizofrênicos. Outro estudo, usando um teste de reconhecimento de letras apresentadas separadamente ao olho esquerdo e ao direito, encontrou que a cafeína (2mg/kg) reverteu a assimetria funcional de voluntários normais, o que se torna interessante desde a proposta de alterações da assimetria em pacientes com esquizofrenia [Crow, 2000]. Em estudo com cafeína e o filtro sensorial P50, também observamos uma inversão dose dependente da taxa de lateralização relacionada ao tempo do P50 (resultados não publicados).

O tabagismo aumentado, tanto em prevalência quanto em número de cigarros, é freqüentemente observado na esquizofrenia, tendo sido proposto ser decorrente de alterações no sistema colinérgico, as quais seriam transitoriamente corrigidas pela nicotina [Adler *et al.*, 1998]. No entanto, a hipofunção da adenosina é uma explicação alternativa, desde que ratos cronicamente tratados com cafeína duplicaram a auto-administração de nicotina e desenvolveram este comportamento mais rapidamente que animais controle [Shoaib *et al.*, 1999]. Além disso, ingestão combinada de nicotina e cafeína é freqüentemente observada em humanos [Shoaib *et al.*, 1999].

A insônia é uma queixa recorrente entre os pacientes com esquizofrenia, freqüentemente requerendo altas doses de antipsicóticos sedativos e de hipnóticos. Keshavan *et al.*, 1998, relataram que os pacientes com esquizofrenia apresentam uma reduzida duração do sono, mais despertar noturno e uma diminuída atividade delta,

particularmente a 1-2Hz. Este é o mesmo perfil induzido por uma baixa dose de cafeína (100mg) ingerida antes de dormir em voluntários normais [Landolt *et al.*, 1995], embora na esquizofrenia as mudanças sejam mais intensas.

7) Adenosina e purinas no tratamento da esquizofrenia:

A eficácia de todos os tratamentos farmacológicos e não-farmacológicos para a esquizofrenia é compatível com a hipótese adenosinérgica. Primeiramente, os antipsicóticos revertem a hiperlocomção (um parâmetro comportamental que se pensa representar os sintomas positivos) induzida pela cafeína. Segundo, que o efeito terapêutico da glicina e análogos em sintomas negativos é baseado em aumentar a atividade NMDA, enquanto o tratamento com baixas doses de NMDA induz liberação de adenosina [Melani *et al.*, 1999] e sedação reversível por teofilina e por um antagonista A1R, mas não por anfetamina [Gimenez-Llort *et al.*, 1995; Karcz-Kubicha *et al.*, 2003]. Em terceiro lugar, a eletroconvulsoterapia (ECT), a estimulação eletromagnética transcraniana (TMS), a hipoglicemia induzida por insulina e a febre (p.ex. induzida por malária), apesar de variados graus de evidência em termos de eficácia, melhoram sintomas assim como aumentam a liberação de adenosina [Dunwiddie & Masino, 2001]. Finalmente, a clozapina segue como o melhor tratamento farmacológico para sintomas positivos refratários da esquizofrenia e é o antipsicótico com os efeitos mais pronunciados em reduzir o limiar convulsivo, como evidenciado pela incidência de 4% de convulsões durante o tratamento. Por definição, este efeito pode ser devido ao aumento da excitação ou a mecanismos inibitórios reduzidos. Considerando que a glicina não foi efetiva para os sintomas negativos em pacientes tratados com clozapina, sugerimos que isso possa ser devido a um incremento sobreposto da atividade excitatória,

a qual, por conseguinte, estimularia a atividade anticonvulsivante endógena da adenosina. Interessantemente, Vainer & Chouinard, 1994, relataram reversão dos efeitos terapêuticos da clozapina pela cafeína em um paciente, o que corrobora com esta especulação. Também, ao contrário do haloperidol, o tratamento crônico com clozapina em ratos estimulou modestamente a atividade da ecto-5'-nucleotidase em estriado, o passo limitante na formação extracelular de adenosina a partir de ATP [Lara *et al.*, 2001a].

Infelizmente, agonistas diretos ou indiretos de adenosina, com claros efeitos sobre o cérebro, ainda não estão disponíveis para uso em humanos. Entretanto, tratamento adjunto com o inibidor do transportador de adenosina, dipiridamol, a 20 mg/dia de haloperidol foi benéfico para os sintomas positivos em pacientes com esquizofrenia, o que se sugeriu derivar da interação adenosina-dopamina [Akhondzadeh *et al.*, 2000]. Propusemos que a interação da adenosina, através dos A1R com outros sistemas de neurotransmissores (p.ex. glutamatérgico) seria mais possivelmente relacionado a este benefício, uma vez que a atividade dopaminérgica é praticamente abolida por 20 mg/dia de haloperidol [Brunstein *et al.*, 2001]. Uma limitação do dipiridamol é a incerteza quanto à sua penetração no SNC. Até onde sabemos, ainda não foi demonstrado que sua administração periférica aumente os níveis centrais de adenosina.

O alopurinol é um inibidor da xantina oxidase, passo final no metabolismo de purinas, convertendo hipoxantina em xantina e xantina em ácido úrico (figura 2). O acúmulo de hipoxantina e xantina pode favorecer a ação da enzima HGPRT, a qual é responsável por resgatar purinas [Nyhan, 1997], possivelmente aumentando seus níveis [Mateos *et al.*, 1987; Lara *et al.*, 2000]. Testamos o efeito do alopurinol, classicamente utilizado para hiperuricemia e gota, como tratamento adjunto em pacientes previamente

refratários a antipsicóticos típicos. Observamos melhora clínica relevante em cerca da metade dos pacientes [Lara *et al.*, 2001b], o que foi recentemente confirmado em um ensaio clínico cruzado, randomizado, controlado por placebo com alopurinol em combinação ao regime antipsicótico (média equivalente a 550 mg/dia de clorpromazina) em uso pelo paciente [Brunstein *et al.*, 2004]. Nove dos 23 pacientes que completaram os dois braços do estudo (total de 12 semanas) responderam ao alopurinol, comparado com nenhum durante a fase do placebo. A resposta foi mais pronunciada para os sintomas positivos e os respondedores tinham um menor tempo de duração da doença. Apesar destes resultados encorajadores, o alopurinol deve ser considerado como um tratamento que interfere no metabolismo de purinas, mais do que diretamente aumentando a adenosina. Ademais, a xantina oxidase promove a formação de espécies reativas de oxigênio e inibe a produção de ácido úrico, o qual foi recentemente reconhecido como um sinal endógeno de morte celular para o sistema imune [Shi *et al.*, 2003]. Em outras palavras, se o ATP é a molécula da vida, seu produto final, o ácido úrico, representa sofrimento e morte celular. Ainda, provavelmente em conjunto com o resgate de purinas, o alopurinol preserva o *pool* de nucleotídeos, incluindo o ATP [Harrison, 2002]. Alguns ou todos esses efeitos podem contribuir para o perfil neuroprotetor do alopurinol observado em vários modelos de dano cerebral [Harrison, 2002], o que o torna interessante para estudos adicionais na esquizofrenia. Adicionalmente, observamos um efeito antiagressivo do alopurinol em pacientes com agressividade refratária devido a condições neurológicas [Lara *et al.*, 2000] e demência [Lara *et al.*, 2003].

8) Achados diretos envolvendo a adenosina e o sistema purinérgico na esquizofrenia:

Estudos sobre a adenosina e o sistema purinérgico na esquizofrenia são escassos. Um estudo pós-mortem relatou um aumento de densidade dos A2AR no estriado de pacientes com esquizofrenia [Kurumaji & Toru, 1998], sem diferenças entre os que tomavam ou não medicação antes de morrer. Embora os autores tenham interpretado esses achados como uma expressão aumentada compensatória dos receptores A2A devido a hiperfunção dopaminérgica, propomos que uma explicação mais adequada poderia ser a de um clássico aumento na expressão compensatório à reduzida atividade adenosinérgica, a qual poderia produzir ou contribuir para o estado hiperdopaminérgico [Lara & Souza, 2000]. Utilizando o mesmo radioligante para A2AR, Johansson *et al.*, 1997, demonstraram uma expressão aumentada desses receptores em estriado de ratos cronicamente tratados com altas doses de cafeína. Deckert *et al.*, 2003, confirmou o aumento na expressão de A2AR, mas encontrou uma correlação com doses prévias de antipsicóticos, o que vai de encontro com dados de roedores cronicamente tratados com antipsicóticos [Parsons *et al.*, 1995].

Uma enzima que pode influenciar indiretamente a produção de adenosina, a serina hidroximetil transferase (SHMT), estava com reduzida afinidade para este substrato nos lobos temporais de pacientes com esquizofrenia [Waziri *et al.*, 1993].

9) Resumo do modelo da disfunção adenosinérgica na esquizofrenia:

Os principais argumentos que sustentam um modelo de disfunção adenosinérgica na esquizofrenia estão resumidos na tabela 1, onde os achados em esquizofrenia e os papéis fisiológicos da adenosina são comparados.

Tabela 1. Comparação entre achados da esquizofrenia e papéis da adenosina

ACHADOS RELACIONADOS À ESQUIZOFRENIA	PAPÉIS DA ADENOSINA OU EFEITOS DOS ANTAGONISTAS DA ADENOSINA (CAFEÍNA E TEOFILINA)
<i>Atividade dopaminérgica aumentada</i> <i>Anfetamina produz sintomas psicóticos</i>	Adenosina inibe atividade dopaminérgica. Agonistas de adenosina revertem efeitos comportamentais da amfetamina em modelos animais.
<i>Todos antipsicóticos são antagonistas D2R</i>	Hiperlocomoção induzida por cafeína é bloqueada por antagonistas D2R.
<i>Sensibilização neuroquímica da atividade dopaminérgica</i>	Sensibilização à dopamina envolve ação diminuída da adenosina através de A1R pré-sinápticos no núcleo acumbens.
<i>Antagonistas NMDA produzem sintomas imitando a esquizofrenia, possivelmente relacionados a aumento na liberação de glutamato</i>	Agonistas adenosinérgicos (especialmente para A1R) revertem efeitos comportamentais e no EEG induzidos por antagonistas NMDA Agonistas A1R inibem a liberação de glutamato Baixa dose de NMDA (o agonista) induz liberação de adenosina e sedação mediada por adenosina
<i>Componente Neurodesenvolvimental</i>	Adenosina é neurotóxica pela ativação de A1R no cérebro imaturo e o mediador da neurotoxicidade induzida por hipóxia. Qualquer fator produzindo desequilíbrio energético cerebral fetal pode promover liberação de adenosina e neurotoxicidade (adenosina como a suposta “via final comum” das complicações na gestação, nascimento e período neonatal).
<i>Curso deteriorante e perda cerebral progressiva.</i>	Adenosina é neuroprotetora em vários modelos animais. Camundongos <i>knockout</i> A1R são mais suscetíveis a hipóxia, o que envolve excitotoxicidade.
<i>Idade de início – final da adolescência e início da idade adulta</i>	Efeitos pré-sinápticos da adenosina na liberação de neurotransmissores torna-se importante somente em sinapses maduras. Alterações comportamentais mais pronunciadas na adolescência comparada à infância na deficiência de adenosina deaminase tratada.
<i>Infecção materna durante a gestação como fator de risco.</i>	Vírus induzem a produção de interleucina-1beta, a qual em concentrações patológicas induz inibição neuronal via ativação de A1R.
<i>Comorbidade com epilepsia</i>	Adenosina é um anticonvulsivante endógeno
<i>Insônia global em pacientes com esquizofrenia, particularmente ↓ da atividade delta em 1-2 Hz.</i>	Adenosina é um promotor do sono Cafeína induz insônia global em voluntários saudáveis, com ↓ da atividade delta em 1-2 Hz.
<i>Déficit de filtro sensorial, como mensurado com o potencial evocado P50 (relação aumentada do P50)</i>	Teofilina reproduz o déficit do filtro sensorial em voluntários saudáveis; adenosina é um modulador inibitório atividade-dependente, com efeito de curta duração (<1 seg) sob estimulação neuronal fisiológica.

<i>Perda ou inversão da lateralização normal</i>	Cafeína reverte a lateralização normal em uma tarefa cognitiva
<i>Performance prejudicada em testes neuropsicológicos</i>	Doses moderadas de cafeína prejudicam a performance no Stroop test
<i>Tabagismo mais prevalente</i>	Tratamento crônico com cafeína dobra o consumo de nicotina e facilita o desenvolvimento do comportamento de auto-administração de nicotina em ratos
<i>Esquizofrenia como uma doença inerente da humanidade</i>	O metabolismo de purinas sofreu alterações evolucionárias significativas, possivelmente levando a reduzida excreção de purinas, principalmente no cérebro. A deficiência de HGPRT, prejudicando o resgate de purinas, produz dano cerebral em humanos, mas não em camundongos.
<i>Superioridade terapêutica da clozapina</i>	Clozapina estimula levemente a atividade da ecto-5'-nucleotidase; Clozapina reduz o limiar convulsivo, possivelmente estimulando a liberação de adenosina como um anticonvulsivante endógeno.
<i>Eficácia de ECT, TMS, febre, hipoglicemia</i>	Todos promovem substancial liberação de adenosina
<i>Cafeína exacerba sintomas; dipiridamol e alopurinol podem ser úteis na esquizofrenia.</i>	Cafeína bloqueia A1R e A2AR; dipiridamol aumenta a adenosina extracelular e o alopurinol inibe a degradação de purinas.

IV - Genética

A esquizofrenia é uma doença de causa multifatorial, tendo a genética um importante papel como demonstrado por vários estudos desde o início do século passado.

Os estudos em famílias, que se iniciaram através de Ernst Rüdin, na Alemanha, inicialmente esbarravam na imprecisão diagnóstica, problema que vem gradativamente diminuindo desde o surgimento dos critérios diagnósticos operacionais. Um diagnóstico mais preciso, associado a um maior refinamento metodológico, possibilitou o surgimento de estudos que demonstram haver uma ocorrência familiar da esquizofrenia [Gottesman, 1991; Kendler & Gardner, 1997].

Os achados de taxa de concordância em gêmeos monozigóticos da ordem de 48% comparativamente a 17% em dizigóticos [Gottesman, 1991], reforçados pelos estudos de adoção, úteis para separar os efeitos genéticos dos ambientais, que sugerem ser a agregação familiar decorrente de fatores genéticos comuns [Heston, 1966; Kety & Ingraham, 1992], ratificam a genética como um dos fatores etiológicos da esquizofrenia. Estima-se que a herdabilidade da doença varie entre 60 e 70% [Rao *et al.*, 1981; McGue *et al.*, 1983] e a hipótese de uma herança poligênica é a mais fortemente aceita [Carter & Chung, 1980; McGue *et al.*, 1983].

A partir de técnicas de genética molecular, foi iniciada a procura pelos genes de suscetibilidade ou predisposição para a esquizofrenia. Estudos de ligação identificaram várias regiões cromossômicas sugestivas, entre elas locos nos cromossomos 22q12-q13 [Pulver *et al.*, 1994], achado confirmado por outros pesquisadores [Coon *et al.*, 1994; Schwab *et al.*, 1995; Vallada *et al.*, 1995]. A esta região está relacionado o gene do receptor A2A de adenosina [Deckert *et al.*, 1997]. Comparativamente aos estudos de ligação, estratégia para se localizar genes de grande magnitude, os estudos de associação se mostram vantajosos em patologias poligênicas e multifatoriais [Risch & Merikangas, 1996], pois possibilitam a detecção de genes com efeitos pequenos ou moderados na etiologia de uma doença. Visando achados em esquizofrenia, vários estudos de associação relacionando polimorfismos de um grande número de genes candidatos têm sido realizados. Os resultados são controversos, mas meta-análises sugerem associação da doença com o polimorfismo Ball no gene do receptor D3 de dopamina [Williams *et al.*, 1998], com o polimorfismo Cys311Ser no gene do receptor dopaminérgico D2 [Glatt *et al.*, 2003a], com o polimorfismo T102C no gene do receptor 5-HT2A de serotonina

[Abdolmaleky *et al.*, 2004] e com o polimorfismo Val158/108Met no gene da enzima catecol O-metiltransferase [Glatt *et al.*, 2003b]. No entanto, nenhum resultado definitivo foi demonstrado até o momento.

De acordo com o modelo de disfunção adenosinérgica, em contraste com o bloqueio intermitente e relativamente fraco dos receptores de adenosina induzido pelas baixas doses de cafeína normalmente ingeridas por humanos, os pacientes esquizofrênicos teriam uma atividade adenosinérgica persistentemente reduzida, talvez por uma menor expressão de receptores de adenosina ou por expressão de receptores com diferentes respostas à ação da adenosina e antagonistas de receptores de adenosina, o que pode ser geneticamente determinado.

As localizações cromossômicas dos genes dos receptores de adenosina A1, no cromossomo 1q31-32.1 [Deckert *et al.*, 1995]; A2A, no cromossomo 22q11-13 [Deckert *et al.*, 1997]; A2B, no cromossomo 17p12 [Jacobson *et al.*, 1995]; e A3, no cromossomo 1p [Monitto *et al.*, 1995] estão determinadas. O gene humano do A2AR contém um módulo de leitura aberto de 1236 pares de bases e codifica uma proteína de 412 aminoácidos [Furlong *et al.*, 1992]. A seqüência codificadora do gene do A2AR é interrompida por um intron de aproximadamente 6.4Kb localizado na região do suposto segundo domínio extracelular [Peterfreund *et al.*, 1995; Le *et al.*, 1996]. Em 1996, Deckert *et al.* descreveram uma variação de ocorrência natural rara no A2AR (substituição Gly-340-Ser) e dois polimorfismos no gene do A2AR, o 405T>C e o 1083T>C (posteriormente renomeado 1976T>C). Posteriormente, outros dois polimorfismos, o 263C>T e o 2592C>Tins, foram detectados neste gene [Alsene *et al.*, 2003].

A partir da localização do gene do A2AR e da detecção de seus polimorfismos, iniciaram-se os estudos buscando a associação entre esses e as doenças psiquiátricas. Referentes ao gene do A2AR, os resultados têm sido mais promissores nos transtornos de ansiedade [Deckert *et al.*, 1998; Alsene *et al.*, 2003; Hamilton *et al.*, 2004]. Em esquizofrenia, um estudo de associação não encontrou relação entre o polimorfismo 1083T>C (1976T>C) e a ocorrência da patologia quando comparados portadores e um grupo controle [Deckert *et al.*, 1996].

Em relação aos polimorfismos 1976C>T e 2592C>Tins, Alsene *et al.*, 2003, identificaram que voluntários saudáveis com os genótipos 1976T/T e 2592Tins/Tins seriam mais suscetíveis ao efeito ansiogênico da cafeína, sugerindo que o polimorfismo 2592C>Tins tenha uma repercussão funcional com relevância comportamental. Já pacientes esquizofrênicos não desenvolveram ansiedade com a administração de altas doses de cafeína [Lucas *et al.*, 1990], o que poderia estar relacionado a estes polimorfismos.

Meehl, 1962, propôs o termo esquizotaxia para descrever os sintomas da doença que teriam determinação puramente genética, envolvendo um gene dominante, o que quase sempre resultaria ou em esquizofrenia ou em esquizotipia. Em 2001, Faraone *et al.* propuseram uma redefinição para a esquizotaxia, descrevendo-a como uma condição causada por uma combinação de múltiplos genes e circunstâncias ambientais adversas, a qual em alguns, progrediria para doenças mais severas do espectro da esquizofrenia. Relataram como centrais na esquizotaxia os sintomas negativos e os déficits cognitivos (déficits neuropsicológicos). Como esta é uma síndrome proposta como central e com

forte determinação genética da esquizofrenia, os achados de biologia molecular para a doença podem estar a ela relacionados.

V - Ojetivos do estudo:

- Criar uma DNAteca de pacientes com esquizofrenia e de sujeitos sem doença psiquiátrica atual ou no passado e sem história de doença mental em familiares em primeiro grau;
- Investigar possíveis diferenças entre pacientes com esquizofrenia e controles sem doença psiquiátrica em relação aos polimorfismos 263C>T e 2592C>Tins do gene do receptor A2A de adenosina.
- Investigar possíveis diferenças entre pacientes com predomínio de sintomas positivos da esquizofrenia (subtipo paranóide da patologia conforme classificação do DSM IV) e controles sem doença psiquiátrica em relação aos polimorfismos 263C>T e 2592C>Tins do gene do receptor A2A de adenosina.
- Determinar relação entre a presença de sintomas negativos e desorganizados da esquizofrenia e os polimorfismos 263C>T e 2592C>Tins do gene do receptor A2A de adenosina.
- Avaliar se há relação entre o uso de clozapina, como parâmetro de gravidade da doença, e os polimorfismos 263C>T e 2592C>Tins do gene do receptor A2A de adenosina.

MATERIAL E MÉTODOS

I - A amostra

Foram selecionados 88 pacientes com o diagnóstico de esquizofrenia ou transtorno esquizoafetivo (74 com esquizofrenia e 14 com transtorno esquizoafetivo) através de entrevista realizada por psiquiatra, utilizando a Entrevista Clínica Estruturada para o DSM IV – Transtornos do Eixo I (SCID I). As informações foram fornecidas pelos pacientes e seus familiares ou responsáveis. O grupo controle foi constituído de 100 voluntários sem doença psiquiátrica atual ou no passado e sem história de doença mental em familiares de primeiro grau, conforme questionário por nós elaborado (em anexo). Os pacientes foram provenientes do banco de voluntários em pesquisas prévias de nosso grupo, da Associação Gaúcha de Familiares e Pacientes com Esquizofrenia (AGAFAPE) e de clínicas privadas da região metropolitana de Porto Alegre, enquanto os controles foram selecionados entre pessoas que coletavam sangue no Hospital São Lucas da PUC-RS. Todos os indivíduos eram brasileiros, tanto no grupo de pacientes quanto no grupo controle.

Os pacientes ou seus responsáveis e os voluntários controles assinaram consentimento informado. O projeto foi aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

II - Construção do Banco de DNAs (DNAteca)

Amostras de 4 ml de sangue venoso periférico dos pacientes e dos controles foram coletadas em tubos com EDTA e armazenadas em freezer -20° C, no Centro de

Biologia Genômica e Molecular da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUC-RS).

Os DNAs foram extraídos das amostras de sangue empregando o kit de extração “Perfect gDNA Blood Mini” (Eppendorf), seguindo as orientações do fabricante. Os DNAs extraídos foram também catalogados e armazenados no referido laboratório da PUC-RS.

III - Genotipagem

Foram investigados os polimorfismos 263C>T e 2592C>Tins do gene que codifica o receptor A2A de adenosina. Os genótipos foram determinados por meio da análise de polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição de produtos gerados pela reação em Cadeia da Polimerase (PCR-RFLP). Para o polimorfismo 263C>T, o par de primers utilizado foi: 5'-TACCCAGAGGCAACCAGATAAAA-3' e 5'-CGAAAAGCCCATTCTACCAAAA-3'. Para o polimorfismo 2592C>Tins, o par de primers utilizado foi: 5'-CAGAGGTGACATTTGACTTTCTT-3' e 5'-CCTGGGACTGAGAAGTGGAT-3'.

Cada reação de PCR continha 0,6 µl MgCl₂ (50 mM), 2 µl dNTP-mix (2 mM), 2 µl de cada primer (2 µM), 0,1 µl Taq polimerase (5U/µl), 2 µl tampão (10x) e 1 µl DNA (200 ng) genômico, totalizando um volume de 20 µl. A temperatura de anelamento foi de 58° C e, ao total, 35 ciclos foram realizados, precedidos por 1 minuto de desnaturação a 94° C e seguidos por 5 minutos de alongamento a 72° C. As condições da análise de PCR-RFLP e o comprimento dos fragmentos estão resumidos na tabela 2. As clivagens foram realizadas a 37° C durante uma hora, conforme orientações do fabricante. Os

produtos da digestão foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida (acrilamida:bisacrilamida = 49:1) a 15% em tampão TBE 1x a 200V por 1 h para o polimorfismo 263C>T e a 200V por 1h e 30min para o polimorfismo 2592C>Tins. Os géis foram corados em água e brometo de etídeo (0,5 µg/ml) durante 10 min ao abrigo da luz e visualizados em transluminador ultra-violeta (U.V.).

Tabela 2 - Condições da análise de PCR-RFLP e comprimento dos fragmentos

Polimorfismo	Produto PCR (pb)	Enzima de restrição	Alelos	Tamanho do fragmento (pb)
263C>T	224	Nse NI	263 C	224
			263 T	167 + 57
2592C>Tins	194	MBO II	2592 C	182 + 12
			2592 Tins	195

IV - Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se o teste qui-quadrado (χ^2) para testar a hipótese nula de não haver diferença entre pacientes e controles na frequência dos alelos e na distribuição dos genótipos. Quando o número de graus de liberdade foi 1 (df = 1), nas tabelas 2X2, foi aplicada a correção para continuidade de Yates. O nível de significância utilizado foi $P < 0.05$.

O equilíbrio das frequências genóticas nos diferentes grupos para os polimorfismos em estudo foi determinado através do cálculo de Hardy-Weinberg,

utilizando um programa *online* fornecido pelo professor Christensen (<http://www.kursus.kvl.dk/shares/vetgen/Popgen/genetik/applets/kitest.htm>), considerando um grupo sem equilíbrio de Hardy-Weinberg quando o valor do qui-quadrado (χ^2) fosse igual ou maior a 3.84.

RESULTADOS

I - Dados demográficos

Entre os pacientes, 67.05% (59/88) eram do sexo masculino e 32.96% (29/88) do feminino, enquanto o grupo controle foi constituído 44% (44/100) por homens e 56% (56/100) por mulheres ($\chi^2_{\text{Yates}} = 9.127$, $df = 1$, $p = 0.003$).

Como não há uma proporcionalidade em relação ao sexo entre os nossos grupos de pacientes e de controles, haveria a possibilidade de as diferenças das frequências alélicas e genótípicas serem devido ao gênero e não à psicopatologia em estudo. Para esclarecer esta questão, comparamos se havia diferenças entre os sexos nas distribuições alélica e genotípica em relação aos dois polimorfismos investigados.

Polimorfismo 263C>T: amostra total do estudo (genótipos: $\chi^2 = 2.408$, $df = 2$, $p = 0.300$; alelos: $\chi^2_{\text{Yates}} = 0.711$, $df = 1$, $p = 0.399$); grupo dos pacientes (genótipos: $\chi^2 = 2.102$, $df = 2$, $p = 0.349$; alelos: $\chi^2_{\text{Yates}} = 0.091$, $df = 1$, $p = 0.763$); grupo dos controles (genótipos: $\chi^2 = 1.492$, $df = 2$, $p = 0.474$; alelos: $\chi^2_{\text{Yates}} = 1.027$, $df = 1$, $p = 0.311$). A tabela 3 apresenta a distribuição entre sexos dos alelos e genótipos referentes ao polimorfismo 263C>T.

Tabela 3 – Distribuição entre gêneros dos alelos e genótipos do polimorfismo 263C>T nos grupos de pacientes e de controles e na amostra total do estudo

	Alelos			Genótipos			
	263C	263Tins	p	263C/C	263C/Tins	263Tins/Tins	p
<u>Amostra total</u>							
Homens (n = 103)	166	40	0.399	67	32	4	0.300
Mulheres (n = 85)	130	40		53	24	8	
<u>Pacientes</u>							
Homens (n = 59)	96	22	0.763	39	18	2	0.349
Mulheres (n = 29)	49	09		22	05	2	
<u>Controles</u>							
Homens (n = 44)	70	18	0.311	28	14	2	0.474
Mulheres (n = 56)	81	31		31	19	6	

Polimorfismo 2592C>Tins: amostra total do estudo (genótipos: $\chi^2 = 0.142$, df = 2, p = 0.931; alelos: $\chi^2_{\text{Yates}} = 0.035$, df = 1, p = 0.851); grupos dos pacientes (genótipos: $\chi^2 = 1.198$, df = 2, p = 0.549; alelos: $\chi^2_{\text{Yates}} = 0.643$, df = 1, p = 0.423); grupo dos controles (genótipos: $\chi^2 = 0.282$, df = 2, p = 0.868; alelos: $\chi^2_{\text{Yates}} = 0.012$, df = 1, p = 0.911). A distribuição entre sexos dos alelos e genótipos referentes ao polimorfismo 2592C>Tins é apresentada na tabela 4.

Tabela 4 – Distribuição entre gêneros dos alelos e genótipos do polimorfismo 2592C>Tins nos grupos de pacientes e de controles e na amostra total do estudo

	Alelos			Genótipos			
	2592C	2592Tins	p	2592C/C	2592C/Tins	2592Tins/Tins	p
<u>Amostra total</u>							
Homens (n = 103)	89	117	0.851	25	39	39	0.931
Mulheres (n = 85)	76	94		21	34	30	
<u>Pacientes</u>							
Homens (n = 59)	56	62	0.423	18	20	21	0.549
Mulheres (n = 29)	32	26		10	12	7	
<u>Controles</u>							
Homens (n = 44)	33	55	0.911	7	19	18	0.868
Mulheres (n = 56)	44	68		11	22	23	

Como resultado, não foi encontrada qualquer correlação entre os polimorfismos 263C>T e 2592C/Tins e gênero.

Quanto à etnia, no grupo de pacientes 80.68% eram brancos, 7.96% negros e 11.36% pardos, enquanto no grupo controle 79.59% eram brancos, 6.12% negros e 14.29% pardos ($\chi^2 = 0.536$, $df = 2$, $p = 0.765$).

A idade média dos pacientes foi de 36 anos (DP = 10.2) e dos controles de 47.7 anos (DP = 16.9).

II - Polimorfismo 2592C>Tins

Relacionado a esse polimorfismo, não houve diferença estatisticamente significativa, comparando-se a distribuição de genótipos entre os pacientes e o grupo controle ($\chi^2 = 4.987$, $df = 2$, $p = 0.083$). Porém, quando os genótipos 2592C/Tins e Tins/Tins foram agrupados, encontramos uma representação significativamente aumentada do genótipo 2592C/C no grupo dos pacientes em relação aos controles ($\chi^2_{\text{Yates}} = 4.117$, $df = 1$, $p = 0.042$). Verificando a frequência alélica deste polimorfismo entre os dois grupos, observamos uma ocorrência significativamente mais elevada da variante 2592C nos pacientes ($\chi^2_{\text{Yates}} = 4.571$, $df = 1$, $p = 0.033$). A tabela 5 apresenta a distribuição dos genótipos e dos alelos em ambos os grupos.

Tabela 5 – Distribuição de alelos e genótipos do polimorfismo 2592C>Tins entre o grupo de pacientes e o grupo controle

	Alelos			Genótipos			
	2592C	2592Tins	p	2592C/C	2592C/Tins	2592Tins/Tins	p
Pacientes (n = 88)	88	88	0.033	28	32	28	0.083
Controles (n = 100)	77	123		18	41	41	
				2592C/Tins + Tins/Tins			
Pacientes (n = 88)				28	60		0.042
Controles (n = 100)				18	82		

Quando excluímos do grupo dos pacientes aqueles com diagnóstico de transtorno esquizoafetivo e o comparamos com o grupo controle, a diferença estatística aproximou-se da significância entre as amostras em relação à distribuição genotípica ($\chi^2 = 5.707$, df

= 2, p = 0.058). Também entre estes grupos houve diferença significativa quando os genótipos 2592C/Tins e Tins/Tins foram agrupados, com representação aumentada do genótipo 2592C/C nos pacientes em relação aos controles ($\chi^2_{\text{Yates}} = 4.878$, df = 1, p = 0.027). Confrontando-se a distribuição de alelos entre estes dois grupos, houve uma ocorrência significativamente maior da variante 2592C entre os pacientes ($\chi^2_{\text{Yates}} = 4.643$, df = 1, p = 0.031). A tabela 6 demonstra a distribuição dos genótipos e dos alelos nestes dois grupos.

Tabela 6 – Distribuição de alelos e genótipos do polimorfismo 2592C>Tins entre o grupo de pacientes, excluídos aqueles com transtorno esquizoafetivo e grupo controle.

	Alelos			Genótipos			
	2592C	2592Tins	p	2592C/C	2592C/Tins	2592Tins/Tins	p
Pacientes (n = 74)	75	73	0.031	25	25	24	0.058
Controles (n = 100)	77	123		18	41	41	
				2592C/Tins + Tins/Tins			
Pacientes (n = 74)				25	49		0.027
Controles (n = 100)				18	82		

Ao selecionarmos para o grupo de pacientes apenas aqueles com predomínio de sintomas positivos em seu quadro clínico (subtipo paranóide da esquizofrenia conforme os critérios do DSM IV) e o compararmos aos controles, encontramos os seguintes resultados: a distribuição dos genótipos não apresentou diferença estatística significativa ($\chi^2 = 5.052$, df = 2, p = 0.080); quando agrupados os genótipos 2592C/Tins e Tins/Tins houve maior representação do genótipo 2592C/C entre os pacientes ($\chi^2_{\text{Yates}} = 4.186$, df = 1, p = 0.041); a frequência alélica foi significativamente diferente entre os grupos, com

uma maior manifestação da variante 2592C no pacientes ($\chi^2_{\text{Yates}} = 4.272$, $df = 1$, $p = 0.039$). A distribuição dos genótipos e dos alelos nestes dois grupos está apresentada na tabela 7.

Tabela 7 – Distribuição de alelos e genótipos do polimorfismo 2592C>Tins entre o grupo de pacientes com predomínio de sintomas positivos e o grupo controle

	Alelos			Genótipos			
	2592C	2592Tins	p	2592C/C	2592C/Tins	2592Tins/Tins	P
Pacientes (n = 63)	64	62	0.039	21	22	20	0.080
Controles (n = 100)	77	123		18	41	41	
					2592C/Tins + Tins/Tins		
Pacientes (n = 63)				21	42		0.041
Controles (n = 100)				18	82		

Visando relacionar o polimorfismo 2592C>Tins aos sintomas negativos da esquizofrenia, baseados nos resultados da SCID I, dividimos o grupo de pacientes em dois, um constituído por aqueles com sintomas negativos e o outro por quem não manifestou estes sintomas ao longo do curso da doença. Encontramos diferença com significância estatística ao compararmos estes dois grupos de pacientes, observando uma representação aumentada do genótipo 2592C/C e reduzida do genótipo 2592C/Tins naqueles com os sintomas negativos (alelos: $\chi^2_{\text{Yates}} = 0.614$, $df = 1$, $p = 0.433$; genótipos: $\chi^2 = 6.800$, $df = 2$, $p = 0.033$). Quando o grupo de pacientes com sintomatologia negativa foi comparado à amostra de controles, verificou-se neste grupo de pacientes uma aumentada representação do genótipo 2592C/C e da variante alélica 2592C (alelos: $\chi^2_{\text{Yates}} = 5.307$, $df = 1$, $p = 0.021$; genótipos: $\chi^2 = 8.830$, $df = 2$, $p = 0.012$). Ao se confrontar as

freqüências alélicas e genóticas do grupo de pacientes sem sintomas negativos às do grupo controle, nenhuma diferença significativa foi demonstrada (alelos: $\chi^2_{\text{Yates}} = 0.674$, $df = 1$, $p = 0.412$; genótipos: $\chi^2 = 1.880$, $df = 2$, $p = 0.391$). Os achados referentes a isto estão na tabela 8.

Tabela 8 – Distribuição de alelos e genótipos do polimorfismo 2592C>Tins nos grupos de pacientes com e sem sintomas negativos e no grupo controle

	Alelos			Genótipos			
	2592C	2592Tins	p	2592C/C	2592C/Tins	2592Tins/Tins	p
Pctes c/ sint. negativos (n=56)	59	53	0.433	22	15	19	0.033
Pctes s/ sint. negativos (n=32)	29	35		6	17	9	
Análise de resíduos do χ^2				p<0.05	p<0.05		
Pctes c/ sint. negativos (n=56)	59	53	0.021	22	15	19	0.012
Controles (n = 100)	77	123		18	41	41	
Análise de resíduos do χ^2				p<0.01			
Pctes s/ sint. negativos (n=32)	29	35	0.412	6	17	9	0.391
Controles (n = 100)	77	123		18	41	41	

O mesmo procedimento de divisão de grupos, conforme registros da SCID I, realizado para os sintomas negativos, foi feito para relacionar o polimorfismo 2592C>Tins aos sintomas desorganizados da esquizofrenia. A comparação do grupo de pacientes com sintomas desorganizados ao de pacientes sem esta sintomatologia não demonstrou qualquer diferença relevante em relação à freqüência de alelos ($\chi^2_{\text{Yates}} = 0.579$, $df = 1$, $p = 0.447$) e distribuição de genótipos ($\chi^2 = 2.245$, $df = 2$, $p = 0.326$).

Porém, quando comparamos o grupo formado apenas pelos pacientes que apresentavam sintomas desorganizados ao grupo controle, verificamos diferença estatisticamente significativa quanto à distribuição dos genótipos, com uma maior representação do 2592C/C entre os pacientes ($\chi^2 = 7.008$, $df = 2$, $p = 0.030$) e quanto à frequência alélica, em que a variante 2592C foi significativamente mais comum nos portadores da doença ($\chi^2_{\text{Yates}} = 4.757$, $df = 1$, $p = 0.029$). Já quando o grupo dos pacientes sem a manifestação de sintomas desorganizados ao longo do curso da doença foi comparado ao grupo controle, não houve significância nem na distribuição genotípica ($\chi^2 = 1.751$, $df = 2$, $p = 0.417$) nem na alélica ($\chi^2_{\text{Yates}} = 1.651$, $df = 1$, $p = 0.199$). A tabela 9 demonstra a distribuição dos alelos e dos genótipos relacionados aos pacientes com e aos sem sintomas desorganizados da esquizofrenia.

Tabela 9 – Distribuição de alelos e genótipos do polimorfismo 2592C>Tins nos grupos de pacientes com e sem sintomas desorganizados e no grupo controle

	Alelos			Genótipos			
	2592C	2592Tins	p	2592C/C	2592C/Tins	2592Tins/Tins	p
Pctes c/ sint. desorg. (n=38)	41	35	0.447	15	11	12	0.326
Pctes s/ sint. desorg. (n=50)	47	53		13	21	16	
Pctes c/ sint. desorg (n=38)	41	35	0.029	15	11	12	0.030
Controles (n = 100)	77	123		18	41	41	
Análise de resíduos do χ^2				p<0.01			
Pctes s/ sint. desorg (n=50)	47	53	0.199	13	21	16	0.417
Controles (n = 100)	77	123		18	41	41	

De posse destes resultados, formamos um grupo constituído apenas pelos pacientes com, ou com história de, sintomas negativos e desorganizados da esquizofrenia e o comparamos ao grupo controle e a um outro, formado pelos pacientes que jamais apresentaram quaisquer destas manifestações. Da comparação entre os dois grupos de pacientes, achamos diferenças genotípicas, mas não alélicas, havendo uma representação aumentada do genótipo 2592C/C e diminuída do 2592C/Tins naqueles com sintomas negativos e desorganizados (alelos: $\chi^2_{\text{Yates}} = 1.169$, $df = 1$, $p = 0.280$; genótipos: $\chi^2 = 7.547$, $df = 2$, $p = 0.023$). Resultados semelhantes foram vistos na confrontação dos dados do grupo de pacientes com sintomas negativos e desorganizados com os do grupo controle, novamente ocorrendo aumento do genótipo 2592C/C e diminuição do 2592C/Tins neste grupo de pacientes (alelos: $\chi^2_{\text{Yates}} = 3.441$, $df = 1$, $p = 0.064$; genótipos: $\chi^2 = 9.344$, $df = 2$, $p = 0.009$). Nenhuma diferença significativa foi verificada na comparação dos grupos de pacientes sem sintomatologia negativa e desorganizada e controles (alelos: $\chi^2_{\text{Yates}} = 0.004$, $df = 1$, $p = 0.948$; genótipos: $\chi^2 = 0.918$, $df = 2$, $p = 0.632$). As distribuições alélicas e genotípicas estão na tabela 10.

Tabela 10 – Distribuição de alelos e genótipos do polimorfismo 2592C>Tins nos grupos de pacientes com e sem sintomas negativos e desorganizados e no grupo controle

	Alelos			Genótipos			
	2592C	2592Tins	p	2592C/C	2592C/Tins	2592Tins/Tins	p
Pctes c/ sint. negativos e desorg. (n=27)	29	25	0.280	12	5	10	0.023
Pctes s/ sint. negativos e desorg. (n=21)	17	25		3	11	7	
Análise de resíduos do χ^2				p<0.05	p<0.05		
Pctes c/ sint. negativos e desorg (n=27)	29	25	0.064	12	5	10	0.009
Controles (n = 100)	77	123		18	41	41	
Análise de resíduos do χ^2				p<0.01	p<0.05		
Pctes s/ sint. negativos e desorg (n=21)	17	25	0.948	3	11	7	0.634
Controles (n = 100)	77	123		18	41	41	

Com o objetivo de verificar se há relação entre a gravidade da esquizofrenia e o polimorfismo 2592C>Tins, utilizamos um parâmetro farmacológico para determinar a gravidade da doença. Como a clozapina é uma medicação habitualmente reservada para pacientes com esquizofrenia refratária às demais classes de antipsicóticos, consideramos aqueles em uso desta droga como apresentando manifestação mais grave da doença em relação aos usuários dos demais antipsicóticos.

A comparação do grupo de pacientes em uso de clozapina com o dos pacientes recebendo outro antipsicótico, não demonstrou qualquer diferença significativa, tanto na distribuição dos genótipos ($\chi^2 = 1.106$, $df = 2$, $p = 0.575$) quanto na frequência dos alelos

($\chi^2_{Yates} = 1.003$, $df = 1$, $p = 0.317$). Também quando comparado o grupo de pacientes em uso de clozapina ao grupo controle não houve diferenças: distribuição genotípica ($\chi^2 = 0.939$, $df = 2$, $p = 0.625$); frequência alélica ($\chi^2_{Yates} = 0.315$, $df = 1$, $p = 0.575$). Estes dados estão demonstrados na tabela 11.

Tabela 11 – Distribuição de alelos e genótipos do polimorfismo 2592C>Tins entre os grupos de pacientes usuários e não usuários de clozapina e o grupo controle

	Alelos			Genótipos			
	2592C	2592Tins	p	2592C/C	2592C/Tins	2592Tins/Tins	p
Pctes c/ clozapina (n=31)	27	35	0.317	8	11	12	0.575
Pctes s/ clozapina (n=53)	56	50		18	20	15	
Pctes c/ clozapina (n=31)	27	35	0.575	8	11	12	0.625
Controles (n = 100)	77	123		18	41	41	

* Por motivos clínicos, quatro pacientes de nossa amostra não estavam utilizando medicação antipsicótica no momento da inclusão no estudo, por isso foram computados 84 pacientes nestes cálculos.

O cálculo do equilíbrio de Hardy-Weinberg para o polimorfismo 2592C>Tins demonstrou os seguintes resultados:

- Estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg os grupos: controle ($\chi^2 = 1.8009$), de pacientes sem sintomas negativos ($\chi^2 = 0.1655$), de pacientes sem sintomas desorganizados ($\chi^2 = 1.2319$), de pacientes sem sintomas negativos e desorganizados ($\chi^2 = 0.1591$), de pacientes com clozapina ($\chi^2 = 2.4010$), de pacientes sem clozapina ($\chi^2 = 3.1259$).

- Não estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg os grupos: total de pacientes ($\chi^2 = 6.5454$), de pacientes - excluídos aqueles com transtorno esquizoafetivo ($\chi^2 = 7.7778$), de pacientes com predomínio de sintomas positivos ($\chi^2 = 5.7234$), de pacientes com sintomas negativos ($\chi^2 = 11.9913$), de pacientes com sintomas desorganizados ($\chi^2 = 6.6211$), de pacientes com sintomas negativos e desorganizados ($\chi^2 = 10.6343$).

III - Polimorfismo 263C>T

Referente ao polimorfismo 263C>T, não encontramos qualquer significância na distribuição dos genótipos e na frequência dos alelos quando comparamos a amostra total de pacientes com os controles (genótipos: $\chi^2 = 1.772$, $df = 2$, $p = 0.412$; alelos: $\chi^2_{Yates} = 1.354$, $df = 1$, $p = 0.245$). O mesmo ocorreu quando aos controles foram comparados o grupo de pacientes que excluía aqueles com transtorno esquizoafetivo (genótipos: $\chi^2 = 1.508$, $df = 2$, $p = 0.470$; alelos: $\chi^2_{Yates} = 1.217$, $df = 1$, $p = 0.270$) e o grupo constituído exclusivamente pelos pacientes com predomínio de sintomas positivos (genótipos: $\chi^2 = 0.444$, $df = 2$, $p = 0.801$; alelos: $\chi^2_{Yates} = 0.286$, $df = 1$, $p = 0.593$). Os achados estão relacionados na tabela 12.

Tabela 12 – Distribuição de alelos e genótipos do polimorfismo 263C>T entre os grupos de pacientes, de pacientes excluídos os com transtorno esquizoafetivo, de pacientes com predomínio de sintomas positivos e o grupo controle

	Alelos			Genótipos			
	263C	263T	p	263C/C	263C/T	263T/T	p
Pacientes (n = 88)	145	31	0.245	61	23	4	0.412
Pctes s/ esquizoafetivos (n=74)	122	26	0.270	51	20	3	0.470
Pctes c/ pred. sint. positivos (n=63)	101	25	0.593	41	19	3	0.801
Controles (n = 100)	154	46		60	34	6	

* Os valores de p são referentes à comparação das amostras das linhas em que se encontra ao grupo controle.

Nenhuma significância estatística em relação ao polimorfismo 263C>T resultou da confrontação dos dados do grupo de pacientes com sintomatologia negativa da doença, atualmente ou no passado, tanto com os dados do grupo sem manifestação destes sintomas (genótipos: $\chi^2 = 0.302$, df = 2, p = 0.860; alelos: $\chi^2_{\text{Yates}} = 0.0$, df = 1, p = 1.0), quanto com os controles (genótipos: $\chi^2 = 1.497$, df = 2, p = 0.473; alelos: $\chi^2_{\text{Yates}} = 0.851$, df = 1, p = 0.356). O mesmo ocorreu ao se comparar o grupo de pacientes sem estes sintomas ao grupo controle (genótipos: $\chi^2 = 0.933$, df = 2, p = 0.627; alelos: $\chi^2_{\text{Yates}} = 0.655$, df = 1, p = 0.418). Resultados demonstrados na tabela 13.

Tabela 13 – Distribuição de alelos e genótipos do polimorfismo 263C>T entre os grupos de pacientes com e sem sintomas negativos e o grupo controle.

	Alelos			Genótipos			
	263C	263T	p	263C/C	263C/T	263T/T	p
Pctes c/ sint. negativos (n=56)	92	20	1.0	39	14	3	0.860
Pctes s/ sint. negativos (n=32)	53	11		22	9	1	
Pctes c/ sint. negativos (n=56)	92	20	0.356	39	14	3	0.473
Controles (n = 100)	154	46		60	34	6	
Pctes s/ sint. negativos (n=32)	53	11	0.418	22	9	1	0.627
Controles (n = 100)	154	46		60	34	6	

Na avaliação do polimorfismo 263C>T em relação à presença de sintomas desorganizados da esquizofrenia, nossos dados não demonstram significância na comparação dos grupos de pacientes com e sem esta sintomatologia (genótipos: $\chi^2 = 0.877$, $df = 2$, $p = 0.645$; alelos: $\chi^2_{Yates} = 0.568$, $df = 1$, $p = 0.451$). Resultado que se repetiu na comparação do grupo com sintomas desorganizados ao grupo controle (genótipos: $\chi^2 = 2.365$, $df = 2$, $p = 0.307$; alelos: $\chi^2_{Yates} = 1.951$, $df = 1$, $p = 0.163$) e do grupo sem estes sintomas ao grupo controle (genótipos: $\chi^2 = 0.569$, $df = 2$, $p = 0.753$; alelos: $\chi^2_{Yates} = 0.197$, $df = 1$, $p = 0.657$). Na tabela 14, estão os dados referentes ao acima exposto.

Tabela 14 – Distribuição de alelos e genótipos do polimorfismo 263C>T entre os grupos de pacientes com e sem sintomas desorganizados e o grupo controle.

	Alelos			Genótipos			
	263C	263T	p	263C/C	263C/T	263T/T	p
Pctes c/ sint. desorg. (n=38)	65	11	0.451	28	9	1	0.645
Pctes s/ sint. desorg. (n=50)	80	20		33	14	3	
Pctes c/ sint. desorg (n=38)	65	11	0.163	28	9	1	0.307
Controles (n = 100)	154	46		60	34	6	
Pctes s/ sint. desorg (n=50)	80	20	0.657	33	14	3	0.753
Controles (n = 100)	154	46		60	34	6	

Ao compararmos o grupo constituído pelos pacientes com história de sintomas negativos e desorganizados da esquizofrenia ao grupo de pacientes sem história destes sintomas, nenhum resultado com significância estatística foi encontrado (genótipos: $\chi^2 = 0.058$, $df = 2$, $p = 0.810$; alelos: $\chi^2_{Yates} = 0.048$, $df = 1$, $p = 0.827$). Também na comparação do grupo de pacientes com história de sintomas negativos e desorganizados ao grupo controle (genótipos: $\chi^2 = 2.718$, $df = 2$, $p = 0.257$; alelos: $\chi^2_{Yates} = 2.022$, $df = 1$, $p = 0.155$) e do grupo de pacientes sem estes sintomas ao grupo controle (genótipos: $\chi^2 = 1.388$, $df = 2$, $p = 0.499$; alelos: $\chi^2_{Yates} = 0.486$, $df = 1$, $p = 0.486$) nenhum resultado estatisticamente significativo foi encontrado. As distribuições alélicas e genotípicas estão na tabela 15.

Tabela 15 – Distribuição de alelos e genótipos do polimorfismo 263C>Tins nos grupos de pacientes com e sem sintomas negativos e desorganizados e no grupo controle

	Alelos			Genótipos			
	263C	263Tins	p	263C/C	263C/Tins	263Tins/Tins	p
Pctes c/ sint. negativos e desorg. (n=27)	47	7	0.827	20	7	0	0.810
Pctes s/ sint. negativos e desorg. (n=21)	35	7		14	7	0	
Pctes c/ sint. negativos e desorg (n=27)	47	7	0.155	20	7	0	0.257
Controles (n = 100)	154	46		60	34	6	
Pctes s/ sint. negativos e desorg (n=21)	35	7	0.486	14	7	0	0.499
Controles (n = 100)	154	46		60	34	6	

Novamente utilizando o uso de clozapina como parâmetro para gravidade da esquizofrenia, relacionamos os dados encontrados com o polimorfismo 263C>T.

Ao se comparar os usuários de clozapina àqueles em uso de outro antipsicótico (genótipos: $\chi^2 = 1.413$, $df = 2$, $p = 0.493$; alelos: $\chi^2_{Yates} = 1.028$, $df = 1$, $p = 0.311$) e ao grupo controle (genótipos: $\chi^2 = 0.036$, $df = 2$, $p = 0.982$; alelos: $\chi^2_{Yates} = 0.0$, $df = 1$, $p = 1.0$), nenhuma diferença estatística foi detectada. O mesmo resultou da comparação do grupo de pacientes usuários de outros antipsicóticos que não a clozapina ao grupo controle (genótipos: $\chi^2 = 2.803$, $df = 2$, $p = 0.246$; alelos: $\chi^2_{Yates} = 2.213$, $df = 1$, $p = 0.137$).

Os achados de distribuição genotípica e alélica relacionados à gravidade da esquizofrenia são apresentados na tabela 16.

Tabela 16 – Distribuição de alelos e genótipos do polimorfismo 263C>T entre os grupos de pacientes usuários e não usuários de clozapina e o grupo controle.

	Alelos			Genótipos			
	263C	263T	p	263C/C	263C/T	263T/T	p
Pctes c/ clozapina (n=31)	48	14	0.311	19	10	2	0.493
Pctes s/ clozapina (n=53)	90	16		39	12	2	
Pctes c/ clozapina (n=31)	48	14	1.0	19	10	2	0.982
Controles (n = 100)	154	46		60	34	6	
Pctes s/ clozapina (n=53)	90	16	0.137	39	12	2	0.246
Controles (n = 100)	154	46		60	34	6	

* Por motivos clínicos, quatro pacientes de nossa amostra não estavam utilizando medicação antipsicótica no momento da inclusão no estudo, por isso foram computados 84 pacientes nestes cálculos.

O cálculo do equilíbrio de Hardy-Weinberg para o polimorfismo 263C>T demonstrou que todos os grupos em estudo estavam em equilíbrio, com os seguintes resultados: grupo total de pacientes ($\chi^2 = 0.8702$), grupo controle ($\chi^2 = 0.1607$), grupo de pacientes – excluídos aqueles com tr. esquizoafetivo ($\chi^2 = 0.3305$), grupo de pacientes com predomínio de sintomas positivos ($\chi^2 = 0.1695$), grupo de pacientes com sintomas negativos ($\chi^2 = 1.2237$), grupo de pacientes sem sintomas negativos ($\chi^2 = 0.0046$), grupo de pacientes com sintomas desorganizados ($\chi^2 = 0.0714$), grupo de pacientes sem sintomas desorganizados ($\chi^2 = 0.7812$), grupo de pacientes com sintomas negativos e desorganizados ($\chi^2 = 0.5989$), grupo de pacientes sem sintomas negativos e desorganizados ($\chi^2 = 0.8399$), grupo de pacientes com clozapina ($\chi^2 = 0.1856$), grupo de pacientes sem clozapina ($\chi^2 = 0.7213$).

DISCUSSÃO

No presente estudo, relacionamos os polimorfismos 263C>T e 2592C>Tins do gene do receptor A2A de adenosina com o diagnóstico, os sintomas positivos, os sintomas negativos, os sintomas desorganizados e a gravidade da esquizofrenia. Nossos resultados demonstraram associações entre a doença e o polimorfismo 2592C>Tins, mas não com o polimorfismo 263C>T.

Em relação ao polimorfismo 2592C>Tins, encontramos evidências de uma associação entre a manifestação da variante alélica 2592C e a ocorrência da esquizofrenia, além de uma tendência, principalmente quando excluídos os portadores do transtorno esquizoafetivo de nossa amostra, de o genótipo 2592C/C estar ligado à etiologia genética desta patologia. Achados semelhantes resultaram do estudo do grupo de pacientes com predomínio de sintomas positivos da doença.

Mesmo em pequenas amostras de pacientes com manifestação de sintomas negativos (n = 56) e de sintomas desorganizados (n = 38) ao longo do curso da esquizofrenia, verificamos uma associação destes grupos sintomáticos ao genótipo 2592C/C. Entre estes sintomas, o que se mostrou mais fortemente relacionado a este genótipo foram os sintomas negativos da patologia, havendo diferença estatisticamente significativa inclusive entre os grupos de pacientes com e sem estas manifestações. Interessantemente, esta associação do genótipo 2592C/C aos sintomas negativos e desorganizados fica ainda mais forte ao selecionarmos um grupo de pacientes com ambas manifestações (negativos/desorganizados) ao longo da doença (n = 27).

Contrariamente ao genótipo 2592C/C, nossos resultados sugerem que o genótipo 2592C/Tins seja protetor contra os sintomas negativos da esquizofrenia, pois comparativamente aos pacientes com esta sintomatologia, ele ocorre com frequência significativamente maior entre os pacientes sem estas manifestações. Não há diferença entre o grupo de pacientes sem os sintomas negativos e o grupo controle quanto às frequências deste genótipo. Em relação aos sintomas desorganizados isoladamente, em nossa amostra os resultados não sugerem papel protetor ao genótipo 2592C/Tins. Comparando-se o grupo de pacientes que manifestaram tanto sintomas negativos quanto desorganizados da esquizofrenia com o grupo de pacientes que jamais apresentou qualquer destes sintomas e com os controles, o genótipo 2592C/Tins foi estatisticamente mais freqüente entre estes dois últimos grupos, sugerindo papel protetor a este genótipo em relação aos sintomas negativos/desorganizados da patologia.

Relativamente ao genótipo 2592Tins/Tins, nenhuma diferença foi observada nas avaliações dos vários grupos em estudo.

Quanto à gravidade da doença, os pacientes usuários de clozapina não diferiram daqueles em uso de outro antipsicótico e dos controles quanto às frequências alélicas e genóticas dos polimorfismos em estudo. Consideramos os usuários de clozapina como portadores de manifestações mais graves da esquizofrenia, pelo fato de a clozapina ser geralmente reservada para pacientes previamente refratários a outras classes de antipsicóticos. Porém, não mensuramos a gravidade da doença através de nenhum outro parâmetro clínico ou farmacológico. Portanto, os polimorfismos estudados podem não estar relacionados à gravidade da esquizofrenia, como sugerem nossos resultados, ou os

usuários de clozapina podem não representar fidedignamente o grupo de pacientes com manifestação mais grave da patologia em nossa amostra.

Alguns dos grupos do estudo não estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg em relação ao polimorfismo 2592C>Tins, enquanto para o polimorfismo 263C>T, todos os grupos estudados encontram-se em equilíbrio genético. Interessantemente, os grupos que não estão em equilíbrio para o polimorfismo 2592C>Tins são exatamente aqueles grupos de pacientes em que encontramos associação do genótipo 2592C/C ou da variante alélica 2592C com a doença ou com seus sintomas característicos. Este achado sugere que a esquizofrenia, ou principalmente seus sintomas negativos e desorganizados, sejam os fatores que interferem nas frequências genótípicas esperadas para esta população, reforçando sua associação com o genótipo 2592C/C.

Antes de qualquer ponderação, devemos considerar que um polimorfismo somente pode ser considerado clinicamente relevante se determina alteração da estrutura e função ou do nível de expressão da proteína codificada pelo gene em que ocorre. Alsene *et al.*, 2003, demonstraram que o polimorfismo 2592C>Tins ocorre em região que se mantém preservada em diferentes espécies, e que este polimorfismo está situado em uma região de curvatura do DNA, evidências as quais sugerem que o polimorfismo 2592C>Tins tenha uma relevância funcional. Uma vez indicada sua provável funcionalidade, relataram que esta esteja possivelmente relacionada a variações na expressão do A2AR, pois o polimorfismo se localiza em região regulatória (3'UTR) do gene que codifica este receptor de adenosina. Porém, evidência mais robusta neste sentido se faz necessária. No mesmo estudo, os autores observaram ainda que o polimorfismo 2592C>Tins está em desequilíbrio de ligação com um polimorfismo

situado na região codificadora do gene, o polimorfismo 1976C>T, o que poderia determinar, além de alterações da expressão do receptor A2A, também modificações em sua estrutura e função. No entanto, até o momento não se evidenciou relevância funcional para este segundo polimorfismo.

Baseados em trabalho demonstrando que o genótipo 1976T/T seria mais freqüente em pessoas com o transtorno do pânico [Deckert *et al.*, 1998], patologia do espectro da ansiedade, Alsene *et al.*, 2003, em seu estudo anteriormente citado, verificaram relação dos polimorfismos 1976C>T e 2592C>Tins com a ansiedade induzida pela cafeína (antagonista A2AR), em que os genótipos 1976T/T e 2592Tins/Tins predisporiam os humanos a esta sintomatologia. Os autores propuseram que essa característica talvez decorresse de alterações na expressão dos A2AR, o que tornaria os portadores destes genótipos mais suscetíveis à ansiedade induzida por cafeína, bastando baixas doses da substância para desencadear este efeito. É interessante ressaltar que Lucas *et al.*, 1990, não observaram indução de ansiedade pela cafeína, com dose única de 10mg/kg, em pacientes com esquizofrenia, demonstrando que estes pacientes são pouco sensíveis ao efeito ansiogênico da substância. A partir destes dados, podemos supor que o fato de a variante 2592C ser mais freqüente entre os esquizofrênicos, como detectado em nossa amostra, poderia ser um fator genético responsável, ao menos em parte, pela menor predisposição aos efeitos ansiogênicos da cafeína entre estes pacientes.

Lucas *et al.*, 1990, também verificaram que sob efeito da cafeína os pacientes com esquizofrenia apresentavam significativa piora dos sintomas de desorganização de pensamento e linguagem, demonstrando a influência que o sistema adenosinérgico pode exercer em sintomas típicos da doença. Se a expressão dos A2AR estiver alterada

naqueles com o genótipo 2592C/C, a adenosina poderá estar menos atuante, com o que os sintomas desorganizados da esquizofrenia se manifestariam com maior frequência. Isso é condizente com nosso achado de o genótipo 2592C/C ocorrer mais comumente em esquizofrênicos com sintomas desorganizados do que em pessoas sem histórico próprio e familiar de doença psiquiátrica.

Alguns estudos atribuem função neuroprotetora aos agonistas A2AR, porém achados mais contundentes têm sido relatados no sentido de o efeito neuroprotetor em que os receptores A2A estariam envolvidos decorrer da ação de antagonistas destes receptores, havendo ainda uma interação dos A2AR com os A1R, através da qual o antagonismo A2AR potencializaria o efeito neuroprotetor via A1R [Wardas, 2002]. A par disto, supomos que as alterações genótípicas e alélicas do polimorfismo 2592C>Tins no gene que codifica o receptor A2A da adenosina, relacionadas à esquizofrenia em nosso estudo, possivelmente interfiram no efeito neuroprotetor ou modulador em que estão envolvidos os receptores adenosinérgicos. Uma expressão alterada dos A2AR poderia causar interferência direta na atividade neuroprotetora via este receptor, repercutindo também na neuroproteção mediada pelos A1R. O prejuízo desta atividade neuroprotetora em portadores do genótipo 2592C/C ou da variante alélica 2592C poderia ser um dos fatores envolvidos na esquizofrenia, mais particularmente nos sintomas negativos e desorganizados desta enfermidade.

No entanto, o achado que consideramos mais interessante em nosso estudo foi o de que pacientes com sintomas negativos e desorganizados da doença diferem marcadamente dos pacientes sem esta sintomatologia e do grupo controle quanto às manifestações genótípicas do polimorfismo 2592C>Tins, com uma representatividade

aumentada do genótipo 2592C/C e diminuída do 2592C/Tins nos pacientes com estes sintomas. Também relevante é o fato de as frequências destes genótipos não diferirem entre os pacientes sem sintomatologia negativa e desorganizada e os controles, reforçando a idéia de serem estes sintomas os responsáveis pelas diferenças genótípicas observadas em nossa amostra. Em 1962, Meehl propôs o conceito da esquizotaxia, o qual foi revisto por Faraone *et al.*, 2001, conferindo aos sintomas negativos e cognitivos um papel central na esquizofrenia, e à sua presença uma maior suscetibilidade genética à doença. Nossos resultados sugerem que o polimorfismo 2592C>Tins do gene que codifica o receptor A2A de adenosina, através de uma representatividade aumentada do genótipo 2592C/C e diminuída do genótipo 2592C/Tins, possa ser um dos fatores genéticos determinantes para a esquizotaxia. Esta, por sua vez, tornaria o indivíduo predisposto a desenvolver esquizofrenia a partir de influências ambientais, como infecções virais, hipóxia [Bullmore *et al.*, 1997], deficiência de vitamina D [McGrath *et al.*, 2004] e hipoglicemia durante o período gestacional, no parto ou no período neonatal.

No único estudo de que temos conhecimento em que polimorfismos do gene do receptor A2A de adenosina foram investigados em pacientes com esquizofrenia, Deckert *et al.*, 1998, não encontraram qualquer correlação entre os polimorfismos e a doença. Embora tenham investigado o polimorfismo 1976C>T que, conforme o estudo de Alsene *et al.*, 2003, estaria ligado ao polimorfismo 2592C>Tins, esse último, assim como o 263C>T, não foi investigado por Deckert *et al.*, 1998, na amostra de esquizofrênicos, dificultando a comparação com os nossos resultados. Outra limitação importante para a comparação entre os estudos é o fato de Deckert *et al.*, 1998, não terem dividido os

pacientes conforme a sintomatologia apresentada para associação com os polimorfismos estudados.

É importante considerarmos algumas limitações de nosso estudo. Nossa amostra é relativamente pequena para análise genotípica; e contém alguns pacientes com transtorno esquizotípico, por isso, fizemos um grupo mais homogêneo de pacientes excluindo aqueles com este diagnóstico. Visando investigar a associação dos polimorfismos em estudo aos grupos sintomáticos da esquizofrenia, criamos subgrupos entre os pacientes, tornando a amostra ainda menor, o que facilita que os achados sejam ao acaso. No entanto, consideramos o fato de todos os pacientes terem sido selecionados através de entrevista diagnóstica semi-estruturada (SCID I), o que limitou o tamanho da amostra, essencial para que esta seja verdadeiramente constituída por aqueles que, segundo diretrizes atualmente vigentes, preenchem os critérios para esquizofrenia. Consideramos a presença de sintomas negativos e desorganizados conforme avaliação no momento da entrevista e pelo relato fornecido pelos pacientes e seus responsáveis. Como os pacientes estavam em tratamento e não os acompanhamos longitudinalmente, em alguns casos a identificação desta sintomatologia pode ter sido prejudicada, embora se saiba que as medicações atualmente disponíveis sejam particularmente eficazes no controle dos sintomas positivos da esquizofrenia, com menor repercussão sobre as manifestações negativas e desorganizadas da doença.

CONCLUSÃO

Nossos resultados preliminares, que necessitam replicação em amostras maiores e por outros grupos de pesquisadores, sugerem que o polimorfismo 2592C>Tins do gene do receptor A2A de adenosina, e não o polimorfismo 263C>T do mesmo gene, esteja associado à esquizofrenia, reforçando a hipótese de que o sistema adenosinérgico esteja envolvido na fisiopatologia da doença. Mais especificamente, este estudo sugere que o genótipo 2592C/C predisponha à esquizotaxia, enquanto o genótipo 2592C/Tins seja protetor contra esta síndrome, a qual é referida como central no desenvolvimento da esquizofrenia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdolmaleky HM, Faraone SV, Glatt SJ, Tsuang MT: Meta-analysis of association between the T102C polymorphism of the 5HT2a receptor gene and schizophrenia. *Schizophr Res* 2004, 67(1): 53-62.
- Abi-Dargham A, Mawlawi O, Lombardo I, Gil R, Martinez D, Huang Y *et al.*: Prefrontal dopamine D1 receptors and working memory in schizophrenia. *J Neurosci* 2002, 22: 3708-3719.
- Abi-Dargham A, Rodenhiser J, Printz D, Zea-Ponce Y, Gil R, Kegeles LS *et al.*: Increased baseline occupancy of D2 receptors by dopamine in schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, 97: 8104-8109.
- Adams B, Moghaddam B: Corticolimbic dopamine neurotransmission is temporally dissociated from the cognitive and locomotor effects of phencyclidine. *J Neurosci* 1998, 18: 5545-5554.
- Adler LE, Olincy A, Waldo M, Harris JG, Griffith J, Stevens K *et al.*: Schizophrenia, sensory gating, and nicotinic receptors. *Schizophr Bull* 1998, 24: 189-202.
- Akhondzadeh S, Shasavand E, Jamilian H, Shabestari O, Kamalipour A: Dipyridamole in the treatment of schizophrenia: adenosine-dopamine receptor interactions. *J Clin Pharm Ther* 2000, 25: 131-137.
- Albus M, Scherer J, Hueber S, Lechleuthner T, Kraus G, Zausinger S *et al.*: The impact of familial loading on gender differences in age at onset of schizophrenia. *Acta Psychiatr Scand* 1994, 89: 132-134.

- Alsene K, Deckert J, Sand P, Wit H: Association Between A2a Receptor Gene polymorphisms and Caffeine-Induced Anxiety. *Neuropsychopharmacology* 2003, 28: 1694–1702.
- Anand A, Charney DS, Oren DA, Berman RM, Hu XS, Cappiello A *et al.*: Attenuation of the neuropsychiatric effects of ketamine with lamotrigine: support for hyperglutamatergic effects of N-methyl-D-aspartate receptor antagonists. *Arch Gen Psychiatry* 2000, 57: 270-276.
- Bauer A, Holschbach MH, Meyer PT, Boy C, Herzog H, Olsson RA *et al.*: In vivo imaging of adenosine A1 receptors in the human brain with [18F]CPFPX and positron emission tomography. *Neuroimage* 2003, 19: 1760-1769.
- Benes FM, Berretta S: GABAergic interneurons: implications for understanding schizophrenia and bipolar disorder. *Neuropsychopharmacology* 2001, 25: 1-27.
- Brody SA, Geyer MA, Large CH: Lamotrigine prevents ketamine but not amphetamine-induced deficits in prepulse inhibition in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 2003, 169: 240-246.
- Browne RG, Welch WM: Stereoselective antagonism of phencyclidine's discriminative properties by adenosine receptor agonists. *Science* 1982, 217: 1157-1159.
- Buckby LE, Lacey MG: Depression of excitatory cortico-nucleus accumbens synaptic transmission in rat brain slices by dopamine, but not adenosine, depends upon intracortical mechanisms. *Exp Brain Res* 2001, 141: 560-566.

- Brunstein MG, Belmonte-de-Abreu P, Souza DO, Lara DR: Therapeutic benefit of adjunctive dipyridamole in schizophrenia is probably due to adenosine-glutamate interactions. *J Clin Pharm Ther* 2001, 26: 155-156.
- Brunstein MG, Ghisolfi ES, Ramos FL, Lara DR: Clinical trial for allopurinol adjuvant therapy for poorly responsive schizophrenia. *Schizophr Res* 67, S142. 2004.
- Bullmore ET, Frangou S, Murray RM: The dysplastic net hypothesis: an integration of developmental and dysconnectivity theories of schizophrenia. *Schizophr Res* 1997, 28: 143-156.
- Busnello ED, Pereira MO, Knapp WP, Salgado CA, Taborda JGV, Knijnik L *et al.*: Morbidade psiquiátrica na população urbana de Porto Alegre. *J Bras Psiquiatr* 1993, 32: 55-60.
- Carpenter WT, Buchanan RW. Esquizofrenia: introdução e panorama geral. In: Kaplan HI, Sadock BJ (eds.); trad. Andrea Callefí et al. *Tratado de psiquiatria* – 6. ed. – Porto Alegre: Artmed, pp. 959-972, 1999.
- Carter CL, Chung CS: Segregation analysis of schizophrenia under a mixed genetic model. *Hum Hered* 1980, 30: 350-356.
- Chen JF, Beilstein M, Xu YH, Turner TJ, Moratalla R, Standaert DG *et al.*: Selective attenuation of psychostimulant-induced behavioral responses in mice lacking A(2A) adenosine receptors. *Neuroscience* 2000, 97: 195-204.
- Chen Y, Graham DI, Stone TW: Release of endogenous adenosine and its metabolites by the activation of NMDA receptors in the rat hippocampus in vivo. *Br J Pharmacol* 1992, 106: 632-638.

- Coon H, Holik J, Hoff M, Reimherr F, Wender P, Myles-Worsley M *et al*: Analysis of chromosome 22 markers in nine schizophrenia pedigrees. *Am J Med Genet* 1994, 54: 72-79.
- Craig CG, White TD: N-methyl-D-aspartate- and non-N-methyl-D-aspartate-evoked adenosine release from rat cortical slices: distinct purinergic sources and mechanisms of release. *J Neurochem* 1993, 60: 1073-1080.
- Crow TJ: Schizophrenia as the price that homo sapiens pays for language: a resolution of the central paradox in the origin of the species. *Brain Res Brain Res Rev* 2000, 31: 118-129.
- Cunha RA: Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. *Neurochem Int* 2001, 38: 107-125.
- Dall'Igna OP, Da Silva AL, Dietrich MO, Hoffmann A, de Oliveira RV, Souza DO *et al*.: Chronic treatment with caffeine blunts the hyperlocomotor but not cognitive effects of the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist MK-801 in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 2003, 166: 258-263.
- De Freitas B, Schwartz G: Effects of caffeine in chronic psychiatric patients. *Am J Psychiatry* 1979, 136: 1337-1338.
- De Jong A, Giel R, Slooff CJ, Wiersma D: Social disability and outcome in schizophrenics patients. *Br J Psychiatry* 1985, 147: 631-636.

- Deakin JF, Slater P, Simpson MD, Gilchrist AC, Skan WJ, Royston MC *et al.*: Frontal cortical and left temporal glutamatergic dysfunction in schizophrenia. *J Neurochem* 1989, 52: 1781-1786.
- Deckert J, Brenner M, Durany N, Zochling R, Paulus W, Ransmayr G *et al.*: Up-regulation of striatal adenosine A(2A) receptors in schizophrenia. *Neuroreport* 2003, 14: 313-316.
- Deckert J, Nothen MM, Bryant SP, Ren H, Wolf HK, Stiles GL *et al.*: Human adenosine A1 receptor gene: systematic screening for DNA sequence variation and linkage mapping on chromosome 1q31-32.1 using a silent polymorphism in the coding region. *Biochem Biophys Res Commun* 1995, 214(2): 614-621.
- Deckert J, Nothen MM, Bryant SP, Schuffenhauer S, Schofield PR, Spurr NK *et al.*: Mapping of the human adenosine A2a receptor gene: relationship to potential schizophrenia loci on chromosome 22q and exclusion from the CATCH 22 region. *Hum Genet* 1997, 99(3): 326-328.
- Deckert J, Nothen MM, Franke P, Delmo C, Fritze J, Knapp M *et al.*: Systematic mutation screening and association study of the A1 and A2a adenosine receptor genes in panic disorder suggest a contribution of the A2a gene to the development of disease. *Mol Psychiatry* 1998, 3: 81–85.
- Deckert J, Nothen MM, Rietschel M, Wildenauer D, Bondy B, Ertl MA *et al.*: Human adenosine A2a receptor (A2aAR) gene: systematic mutation screening in patients with schizophrenia. *J Neural Transm* 1996, 103: 1447–1455.

- Diaz-Cabiale Z, Hurd Y, Guidolin D, Finnman UB, Zoli M, Agnati LF *et al.*: Adenosine A2A agonist CGS 21680 decreases the affinity of dopamine D2 receptors for dopamine in human striatum. *Neuroreport* 2001, 12: 1831-1834.
- Domyo T, Kurumaji A, Toru M: An increase in [3H]SCH23390 binding in the cerebral cortex of postmortem brains of chronic schizophrenics. *J Neural Transm* 2001, 108: 1475-1484.
- Dunwiddie TV, Masino SA: The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annu Rev Neurosci* 2001, 24: 31-55.
- Dursun SM, Deakin JF: Augmenting antipsychotic treatment with lamotrigine or topiramate in patients with treatment-resistant schizophrenia: a naturalistic case-series outcome study. *J Psychopharmacol* 2001, 15: 297-301.
- Faraone SV, Green AI, Seidman LJ, Tsuang MT: "Schizotaxia": clinical implications and new directions for research. *Schizophr Bull.* 2001, 27(1): 1-18.
- Farde L, Wiesel FA, Stone-Elander S, Halldin C, Nordstrom AL, Hall H *et al.*: D2 dopamine receptors in neuroleptic-naive schizophrenic patients. A positron emission tomography study with [11C]raclopride. *Arch Gen Psychiatry* 1990, 47: 213-219.
- Ferre S: Adenosine-dopamine interactions in the ventral striatum. Implications for the treatment of schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl)* 1997, 133: 107-120.
- Ferre S, von Euler G, Johansson B, Fredholm BB, Fuxe K: Stimulation of high-affinity adenosine A2 receptors decreases the affinity of dopamine D2 receptors in rat striatal membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991, 88: 7238-7241.

- Foreman N, Barraclough S, Moore C, Mehta A, Madon M: High doses of caffeine impair performance of a numerical version of the Stroop task in men. *Pharmacol Biochem Behav* 1989, 32: 399-403.
- Frankle WG, Lerma J, Laruelle M: The synaptic hypothesis of schizophrenia. *Neuron* 2003, 39: 205-216.
- Fredholm BB, Battig K, Holmen J, Nehlig A, Zvartau EE: Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacol Rev* 1999, 51: 83-133.
- Furlong T, Pierce K, Selbie L, Shine J: Molecular characterization of a human brain adenosine A2a receptor. *Mol Brain Res* 1992, 15: 62-66.
- Ghisolfi ES, Prokopiuk AS, Becker J, Ehlers JA, Belmonte-de-Abreu P, Souza DO *et al.*: The adenosine antagonist theophylline impairs p50 auditory sensory gating in normal subjects. *Neuropsychopharmacology* 2002, 27: 629-637.
- Gimenez-Llort L, Martinez E, Ferre S: Dopamine-independent and adenosine-dependent mechanisms involved in the effects of N-methyl-D-aspartate on motor activity in mice. *Eur J Pharmacol* 1995, 275: 171-177.
- Glatt SJ, Faraone SV, Tsuang MT: Association between a functional catechol O-methyltransferase gene polymorphism and schizophrenia: meta-analysis of case-control and family-based studies. *Am J Psychiatry* 2003b, 160(3): 469-476.
- Glatt SJ, Faraone SV, Tsuang MT: Meta-analysis identifies an association between the dopamine D2 receptor gene and schizophrenia. *Mol Psychiatry* 2003a, 8(11): 911-915.

- Golembiowska K, Zylewska A: Agonists of A1 and A2A adenosine receptors attenuate methamphetamine-induced overflow of dopamine in rat striatum. *Brain Res* 1998, 806: 202-209.
- Gottesman II: *Schizophrenia Gênesis: The Origins of Madness*. New York: WH Freeman Co; 1991.
- Hamilton SP, Slager SL, De Leon AB, Heiman GA, Klein DF, Hodge SE *et al*: Evidence for genetic linkage between a polymorphism in the adenosine A2A receptor and panic disorder. *Neuropsychopharmacology* 2004, 29(3): 558-565.
- Harrison R: Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? *Free Radic Biol Med* 2002, 33: 774-797.
- Hauber W, Andersen R: The non-NMDA glutamate receptor antagonist GYKI 52466 counteracts locomotor stimulation and anticataleptic activity induced by the NMDA antagonist dizocilpine. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1993, 348: 486-490.
- Heckers S, Stone D, Walsh J, Shick J, Koul P, Benes FM: Differential hippocampal expression of glutamic acid decarboxylase 65 and 67 messenger RNA in bipolar disorder and schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 2002, 59: 521-529.
- Heresco-Levy U, Javitt DC, Ermilov M, Mordel C, Silipo G, Lichtenstein M: Efficacy of high-dose glycine in the treatment of enduring negative symptoms of schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 1999, 56: 29-36.
- Hesslinger B, Normann C, Langosch JM, Klose P, Berger M, Walden J: Effects of carbamazepine and valproate on haloperidol plasma levels and on psychopathologic outcome in schizophrenic patients. *J Clin Psychopharmacol* 1999, 19: 310-315.

- Heston LL: Psychiatric disorders in Foster-home-reared children of schizophrenic mothers. *Br J Psychiatry* 1966, 112: 819-825.
- Hillion J, Canals M, Torvinen M, Casado V, Scott R, Terasmaa A *et al.*: Coaggregation, cointernalization, and codesensitization of adenosine A2A receptors and dopamine D2 receptors. *J Biol Chem* 2002, 277: 18091-18097.
- Hughes JR, McHugh P, Holtzman S: Caffeine and schizophrenia. *Psychiatr Serv* 1998, 49: 1415-1417.
- Jacobson MA, Johnson RG, Luneau CJ, Salvatore CA: Cloning and chromosomal localization of the human A2b adenosine receptor gene (ADORA2B) and its pseudogene. *Genomics* 1995, 27: 374-376.
- Johansson B, Georgiev V, Lindstrom K, Fredholm BB: A1 and A2A adenosine receptors and A1 mRNA in mouse brain: effect of long-term caffeine treatment. *Brain Res* 1997, 762: 153-164.
- Johansson B, Halldner L, Dunwiddie TV, Masino SA, Poelchen W, Gimenez-Llort L *et al.*: Hyperalgesia, anxiety, and decreased hypoxic neuroprotection in mice lacking the adenosine A1 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, 98: 9407-9412.
- Kafka SH, Corbett R: Selective adenosine A2A receptor/dopamine D2 receptor interactions in animal models of schizophrenia. *Eur J Pharmacol* 1996, 295: 147-154.
- Kapur S: Psychosis as a state of aberrant salience: a framework linking biology, phenomenology, and pharmacology in schizophrenia. *Am J Psychiatry* 2003, 160: 13-23.

- Kapur S, Zipursky R, Jones C, Shammi CS, Remington G, Seeman P: A positron emission tomography study of quetiapine in schizophrenia: a preliminary finding of an antipsychotic effect with only transiently high dopamine D2 receptor occupancy. *Arch Gen Psychiatry* 2000, 57: 553-559.
- Karcz-Kubicha M, Quarta D, Hope BT, Antoniou K, Muller CE, Morales M *et al.*: Enabling role of adenosine A1 receptors in adenosine A2A receptor-mediated striatal expression of c-fos. *Eur J Neurosci* 2003, 18: 296-302.
- Kegeles LS, Abi-Dargham A, Zea-Ponce Y, Rodenhiser-Hill J, Mann JJ, Van Heertum RL *et al.*: Modulation of amphetamine-induced striatal dopamine release by ketamine in humans: implications for schizophrenia. *Biol Psychiatry* 2000, 48: 627-640.
- Kendler K, Gardner C: The risk for psychiatric disorders in relatives of schizophrenic and control probands: a comparison of three independent studies. *Psychol Medicine* 1997, 27: 411-419.
- Keshavan MS, Reynolds CF, III, Miewald MJ, Montrose DM, Sweeney JA, Vasko RC, Jr. *et al.*: Delta sleep deficits in schizophrenia: evidence from automated analyses of sleep data. *Arch Gen Psychiatry* 1998, 55: 443-448.
- Kety SS, Ingrahan LJ: Genetic transmission and improved diagnosis of schizophrenia from pedigrees of adoptees. *J Psychiatr Res* 1992, 26: 247-255.
- Koch M, Hauber W: Regulation of sensorimotor gating by interactions of dopamine and adenosine in the rat. *Behav Pharmacol* 1998, 9: 23-29.

- Krystal JH, Anand A, Moghaddam B: Effects of NMDA receptor antagonists: implications for the pathophysiology of schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 2002, 59: 663-664.
- Kurumaji A, Toru M: An increase in [3H] CGS21680 binding in the striatum of postmortem brains of chronic schizophrenics. *Brain Res* 1998, 808: 320-323.
- Kuzmin A, Johansson B, Zvartau EE, Fredholm BB: Caffeine, acting on adenosine A(1) receptors, prevents the extinction of cocaine-seeking behavior in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 1999, 290: 535-542.
- Landolt HP, Dijk DJ, Gaus SE, Borbely AA: Caffeine reduces low-frequency delta activity in the human sleep EEG. *Neuropsychopharmacology* 1995, 12: 229-238.
- Lang UE, Lang F, Richter K, Vallon V, Lipp HP, Schnermann J *et al.*: Emotional instability but intact spatial cognition in adenosine receptor A1 knock out mice. *Behav Brain Res* 2003, 145: 179-188.
- Lara DR: Inhibitory deficit in schizophrenia is not necessarily a GABAergic deficit. *Cell Mol Neurobiol* 2002, 22: 239-247.
- Lara DR, Abreu PB: Esquizofrenia. In: Kapczinski F, Quevedo J, Izquierdo I (eds.). *Bases Biológicas dos Transtornos Psiquiátricos*. Porto Alegre: Artmed, pp. 109-117, 2000.
- Lara DR, Belmonte-de-Abreu P, Souza DO: Allopurinol for refractory aggression and self-inflicted behaviour. *J Psychopharmacol* 2000, 14: 81-83.

- Lara DR, Brunstein MG, Ghisolfi ES, Lobato MI, Belmonte-de-Abreu P, Souza DO: Allopurinol augmentation for poorly responsive schizophrenia. *Int Clin Psychopharmacol* 2001b, 16: 235-237.
- Lara DR, Cruz MR, Xavier F, Souza DO, Moriguchi EH: Allopurinol for the treatment of aggressive behaviour in patients with dementia. *Int Clin Psychopharmacol* 2003, 18: 53-55.
- Lara DR, Souza DO: Schizophrenia: a purinergic hypothesis. *Med Hypotheses* 2000, 54: 157-166.
- Lara DR, Viana MR, de Paris F, Quevedo J, Oses JP, Basttatini AM *et al*: Chronic treatment with clozapine, but not haloperidol, increases striatal ecto-5'-nucleotidase activity in rats. *Neuropsychobiology* 2001a, 44: 99-102.
- Laruelle M: The role of endogenous sensitization in the pathophysiology of schizophrenia: implications from recent brain imaging studies. *Brain Res Brain Res Rev* 2000, 31: 371-384.
- Laruelle M, Abi-Dargham A: Dopamine as the wind of the psychotic fire: new evidence from brain imaging studies. *J Psychopharmacol* 1999, 13: 358-371.
- Le F, Townsend-Nicholson A, Backer E, Sutherland GR, Schofield PF: Characterization and chromosomal localization of the human A2a adenosine receptor subtype gene: ADORA2A. *Biochem Biophys Res Commun* 1996, 223: 461-467.
- Ledent C, Vaugeois JM, Schiffmann SN, Pedrazzini T, El Yacoubi M, Vanderhaeghen JJ *et al*.: Aggressiveness, hypoalgesia and high blood pressure in mice lacking the adenosine A2a receptor. *Nature* 1997, 388: 674-678.

Lieberman JA, Sheitman BB, Kinon BJ: Neurochemical sensitization in the pathophysiology of schizophrenia: deficits and dysfunction in neuronal regulation and plasticity. *Neuropsychopharmacology* 1997, 17: 205-229.

Lindstrom LH, Gefvert O, Hagberg G, Lundberg T, Bergstrom M, Hartvig P *et al.*: Increased dopamine synthesis rate in medial prefrontal cortex and striatum in schizophrenia indicated by L-(beta-11C) DOPA and PET. *Biol Psychiatry* 1999, 46: 681-688.

Lucas PB, Pickar D, Kelsoe J, Rapaport M, Pato C, Hommer D: Effects of the acute administration of caffeine in patients with schizophrenia. *Biol Psychiatry* 1990, 28: 35-40.

Mackay DC, Rollins JW: Caffeine and caffeinism. *J R Nav Med Serv* 1989, 75: 65-67.

Makikyro T, Karvonen JT, Hakko H, Nieminen P, Joukamaa M, Isohanni M *et al.*: Comorbidity of hospital-treated psychiatric and physical disorders with special reference to schizophrenia: a 28 year follow-up of the 1966 northern Finland general population birth cohort. *Public Health* 1998, 112: 221-228.

Mansheim P: A case of acute psychosis in temporal association with theophylline toxicity. *J Clin Psychopharmacol* 1989, 9: 65-66.

Manual diagnóstico e estatístico dos transtornos mentais. 4.ed. Washington: Associação Psiquiátrica Americana, 1994.

- Manzoni OJ, Manabe T, Nicoll RA: Release of adenosine by activation of NMDA receptors in the hippocampus. *Science* 1994, 265: 2098-2101.
- Manzoni O, Pujalte D, Williams J, Bockaert J: Decreased presynaptic sensitivity to adenosine after cocaine withdrawal. *J Neurosci* 1998, 18: 7996-8002.
- Mateos FA, Puig JG, Jimenez ML, Fox IH: Hereditary xanthinuria. Evidence for enhanced hypoxanthine salvage. *J Clin Invest* 1987, 79: 847-852.
- McGrath J, Saari K, Hakko H, Jokelainen J, Jones P, Jarvelin MR *et al.*: Vitamin D supplementation during the first year of life and risk of schizophrenia: a Finnish birth cohort study. *Schizophr Res* 2004, 67: 237-245.
- McGue M, Gottesman II, Rao DC: The transmission of schizophrenia under a multifactorial threshold model. *Am J Hum Genet* 1983, 35: 1161-1178.
- McManamy MC, Schube PG: Caffeine intoxication. Report of case, symptoms of which amounted to psychosis. *N Engl J Med* 1936, 215: 616-620.
- Meehl PE: Schizotaxia, schizotypy, schizophrenia. *Am Psychol* 1962: 827-838.
- Melani A, Corsi C, Gimenez-Llort L, Martinez E, Ogren SO, Pedata F *et al.*: Effect of N-methyl-D-aspartate on motor activity and in vivo adenosine striatal outflow in the rat. *Eur J Pharmacol* 1999, 385: 15-19.
- Meyer-Lindenberg A, Miletich RS, Kohn PD, Esposito G, Carson RE, Quarantelli M *et al.*: Reduced prefrontal activity predicts exaggerated striatal dopaminergic function in schizophrenia. *Nat Neurosci* 2002, 5: 267-271.
- Mikkelsen EJ: Caffeine and schizophrenia. *J Clin Psychiatry* 1978, 39: 732-736.

- Mitchell JB, Lupica CR, Dunwiddie TV: Activity-dependent release of endogenous adenosine modulates synaptic responses in the rat hippocampus. *J Neurosci* 1993, 13: 3439-3447.
- Moghaddam B, Adams BW: Reversal of phencyclidine effects by a group II metabotropic glutamate receptor agonist in rats. *Science* 1998, 281: 1349-1352.
- Moghaddam B, Adams B, Verma A, Daly D: Activation of glutamatergic neurotransmission by ketamine: a novel step in the pathway from NMDA receptor blockade to dopaminergic and cognitive disruptions associated with the prefrontal cortex. *J Neurosci* 1997, 17: 2921-2927.
- Monitto CL, Levitt RC, DiSilvestre D, Holroyd KJ: Localization of the A3 adenosine receptor gene (ADORA3) to human chromosome 1p. *Genomics* 1995, 26(3): 637-638.
- Murray CJL, Lopez AD: *The global burden of disease*. Harvard School of Public Health, 1996.
- Newman SC, Bland RC: Mortality in a cohort of patients with schizophrenia: a record linkage study. *Can J Psychiatry* 1991, 36: 239-245.
- Nyhan WL: The recognition of Lesch-Nyhan syndrome as an inborn error of purine metabolism. *J Inherit Metab Dis* 1997, 20: 171-178.
- Okada M, Mizuno K, Kaneko S: Adenosine A1 and A2 receptors modulate extracellular dopamine levels in rat striatum. *Neurosci Lett* 1996, 212: 53-56.

- Okamura N, Hashimoto K, Shimizu E, Kumakiri C, Komatsu N, Iyo M: Adenosine A(1) receptor agonists block the neuropathological changes in rat retrosplenial cortex after administration of the NMDA receptor antagonist dizocilpine. *Neuropsychopharmacology* 2004, 29: 544-550.
- Olney JW, Farber NB: Glutamate receptor dysfunction and schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 1995, 52: 998-1007.
- Parsons B, Togasaki DM, Kassir S, Przedborski S: Neuroleptics up-regulate adenosine A2a receptors in rat striatum: implications for the mechanism and the treatment of tardive dyskinesia. *J Neurochem* 1995, 65: 2057-2064.
- Peterfreund RA, MacCollin M, Gusella J, Fink JS: Characterization and expression of the human A2a adenosine receptor gene. *J Neurochem* 1995, 66: 362-368.
- Pinna A, Wardas J, Cristalli G, Morelli M: Adenosine A2A receptor agonists increase Fos-like immunoreactivity in mesolimbic areas. *Brain Res* 1997, 759: 41-49.
- Popoli P, Pezzola A, de Carolis AS: Modulation of striatal adenosine A1 and A2 receptors induces rotational behaviour in response to dopaminergic stimulation in intact rats. *Eur J Pharmacol* 1994, 257: 21-25.
- Popoli P, Reggio R, Pezzola A: Adenosine A1 and A2 receptor agonists significantly prevent the electroencephalographic effects induced by MK-801 in rats. *Eur J Pharmacol* 1997, 333: 143-146.
- Powell KR, Iuvone PM, Holtzman SG: The role of dopamine in the locomotor stimulant effects and tolerance to these effects of caffeine. *Pharmacol Biochem Behav* 2001, 69: 59-70.

- Pulver AE, Karayiorgou M, Wolyniec PS, Lasseter VK, Kasch L, Nesdaft G, *et al.*: Sequential strategy to identify a susceptibility gene for schizophrenia: report of potential linkage on chromosome 22q12-q13.1: Part 1. *American Journal of Medical Genetics* 1994, 54: 36-43.
- Quarta D, Ferre S, Solinas M, You ZB, Hockemeyer J, Popoli P *et al.*: Opposite modulatory roles for adenosine A1 and A2A receptors on glutamate and dopamine release in the shell of the nucleus accumbens. Effects of chronic caffeine exposure. *J Neurochem* 2004, 88: 1151-1158.
- Ralevic V, Burnstock G: Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* 1998, 50: 413-492.
- Rao DC, Morton NE, Gottesman II, Lew R: Path analysis of qualitative data on pairs of relative: application to schizophrenia. *Human Heredity* 1981, 31: 325-333.
- Rimondini R, Ferre S, Gimenez-Llort L, Ogren SO, Fuxe K: Differential effects of selective adenosine A1 and A2A receptor agonists on dopamine receptor agonist-induced behavioural responses in rats. *Eur J Pharmacol* 1998, 347: 153-158.
- Rimondini R, Ferre S, Ogren SO, Fuxe K: Adenosine A2A agonists: a potential new type of atypical antipsychotic. *Neuropsychopharmacology* 1997, 17: 82-91.
- Rish N, Merikangas K: The future of genetic studies of complex human diseases. *Science* 1996, 273: 1516-1517.

- Rivkees SA, Price SL, Zhou FC: Immunohistochemical detection of A1 adenosine receptors in rat brain with emphasis on localization in the hippocampal formation, cerebral cortex, cerebellum, and basal ganglia. *Brain Res* 1995, 677: 193-203.
- Schepherd M, Watt DC, Falloon I, Smeeton N: The natural history of schizophrenia: a 5-year follow-up study of outcome and prediction in a representative sample of schizophrenia. *Psychological Med* 1989, Supl 15: 1-46.
- Schwab SG, Lerer B, Albus M, Maier W, Hallmayer J, Fimmers R *et al*: Potential linkage for schizophrenia on chromosome 22q12-13: a replication study. *Am J Med Genet* 1995, 60: 436-443.
- Seeman P, Tallerico T: Antipsychotic drugs which elicit little or no parkinsonism bind more loosely than dopamine to brain D2 receptors, yet occupy high levels of these receptors. *Mol Psychiatry* 1998, 3: 123-134.
- Shi D, Nikodijevic O, Jacobson KA, Daly JW: Chronic caffeine alters the density of adenosine, adrenergic, cholinergic, GABA, and serotonin receptors and calcium channels in mouse brain. *Cell Mol Neurobiol* 1993, 13: 247-261.
- Shi Y, Evans JE, Rock KL: Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature* 2003, 425: 516-521.
- Shimazoe T, Yoshimatsu A, Kawashimo A, Watanabe S: Roles of adenosine A(1) and A(2A) receptors in the expression and development of methamphetamine-induced sensitization. *Eur J Pharmacol* 2000, 388: 249-254.
- Shoaib M, Swanner LS, Yasar S, Goldberg SR: Chronic caffeine exposure potentiates nicotine self-administration in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 1999, 142: 327-333.

- Solinas M, Ferre S, You ZB, Karcz-Kubicha M, Popoli P, Goldberg SR: Caffeine induces dopamine and glutamate release in the shell of the nucleus accumbens. *J Neurosci* 2002, 22: 6321-6324.
- Sills TL, Azampanah A, Fletcher PJ: The adenosine A1 receptor agonist N6-cyclopentyladenosine blocks the disruptive effect of phencyclidine on prepulse inhibition of the acoustic startle response in the rat. *Eur J Pharmacol* 1999, 369: 325-329.
- Stoner GR, Skirboll LR, Werkman S, Hommer DW: Preferential effects of caffeine on limbic and cortical dopamine systems. *Biol Psychiatry* 1988, 23: 761-768.
- Svenningsson P, Fredholm BB: Exciting news about A2A receptors. *Neurology* 2003, 61: S10-S11.
- Toda S, Alguacil LF, Kalivas PW: Repeated cocaine administration changes the function and subcellular distribution of adenosine A1 receptor in the rat nucleus accumbens. *J Neurochem* 2003, 87: 1478-1484.
- Ushijima I, Katsuragi T, Furukawa T: Involvement of adenosine receptor activities in aggressive responses produced by clonidine in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 1984, 83: 335-339.
- Vainer JL, Chouinard G: Interaction between caffeine and clozapine. *J Clin Psychopharmacol* 1994, 14: 284-285.
- Vallada HP, Gill M, Sham P, Lim LCC, Nanko S, Asherson P *et al.*: Linkage studies on chromosome 22 in familial schizophrenia. *Am J Med Genet* 1995, 60: 139-146.

- Von Lubitz DK, Paul IA, Carter M, Jacobson KA: Effects of N6-cyclopentyl adenosine and 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine on N-methyl-D-aspartate induced seizures in mice. *Eur J Pharmacol* 1993, 249: 265-270.
- Wang JH, Short J, Ledent C, Lawrence AJ, Buuse M: Reduced startle habituation and prepulse inhibition in mice lacking the adenosine A2A receptor. *Behav Brain Res* 2003, 143: 201-207.
- Wardas J: Neuroprotective role of adenosine in the CNS. *Pol J Pharmacol* 2002, 54: 313-326.
- Wassef AA, Dott SG, Harris A, Brown A, O'Boyle M, Meyer WJ, III *et al.*: Critical review of GABA-ergic drugs in the treatment of schizophrenia. *J Clin Psychopharmacol* 1999, 19: 222-232.
- Watt DC, Katz K, Shepherd M: The natural history of schizophrenia: a 5-year follow-up of a representative sample of schizophrenia by means of a standardized clinical and social assessment. *Psychological Med* 1983, 13: 663-670.
- Waziri R, Baruah S, Sherman AD: Abnormal serine-glycine metabolism in the brains of schizophrenics. *Schizophr Res* 1993, 8: 233-243.
- Williams J, Spurlock G, Holmans P, Mant R, Murphy K, Jones L *et al.*: A meta-analysis and transmission disequilibrium study of association between the dopamine D3 receptor gene and schizophrenia. *Mol Psychiatry* 1998, 3(2): 141-149.
- Winterer G, Hermann WM: Valproate and the symptomatic treatment of schizophrenia spectrum patients. *Pharmacopsychiatry* 2000, 33: 182-188.

Zimmermann H: Biochemistry, localization and functional roles of ecto-nucleotidases in the nervous system. *Prog Neurobiol* 1996, 49: 589-618.

Anexo

QUESTIONÁRIO PARA CONTROLES

Dados de identificação:

Idade: Sexo: Etnia:

Profissão:

Naturalidade:

Procedência:

História médica:

1- O senhor(a) está ou já esteve em tratamento por alguma doença psiquiátrica?

sim não

2- Seus pais ou irmãos já apresentaram algum transtorno psiquiátrico (esquizofrenia, depressão, transtorno bipolar, demência, alcoolismo, suicídio,...)?

sim não não sei informar

3- O senhor(a) tem alguma doença crônica (pressão alta, diabetes, câncer,...)?

sim não

Se sim, qual? _____