



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**FACULDADE DE MEDICINA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS: PSIQUIATRIA**

**TESE DE DOUTORADO**

**ESTRESSE OXIDATIVO E INFLAMAÇÃO EM DIFERENTES ESTÁGIOS  
DA ESQUIZOFRENIA**

Mariana Pedrini Uebel  
Orientadora: Prof. Dra. Clarissa S. Gama

**PORTO ALEGRE, DEZEMBRO DE 2013.**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**FACULDADE DE MEDICINA**

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS: PSIQUIATRIA

TESE DE DOUTORADO

**ESTRESSE OXIDATIVO E INFLAMAÇÃO EM DIFERENTES FASES DA  
ESQUIZOFRENIA**

Mariana Pedrini Uebel

Orientadora:

Prof. Dra. Clarissa S. Gama

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação  
em Ciências Médicas: Psiquiatria,  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial  
para obtenção do título de Doutora.

Porto Alegre, Brasil.  
2013

## SUMÁRIO

Abreviaturas e Siglas	4
Resumo	5
Abstract	7
1. Introdução	9
2. Revisão da Literatura	12
2.1 Esquizofrenia	12
2.1.1 Diagnóstico	12
2.1.2 Epidemiologia e Fatores de Risco	17
2.1.3 Esquizofrenia e Cognição	19
2.1.4 Aspectos Neurobiológicos da Esquizofrenia	20
2.2 Estresse Oxidativo	23
2.3 Citocinas	28
3. Referências	32
4. Justificativa	46
5. Objetivos	47
6. Métodos	48
7. Aspectos Éticos	51
8. Artigos	52
9. Considerações Finais	88
10. Anexos	90
10.1 Artigos não Relacionados à Tese Publicados no Período do Doutorado	91
10.1.1 Artigo Anexo I	92
10.1.2 Artigo Anexo II	94
10.1.3 Artigo Anexo III	96
10.1.4 Artigo Anexo IV	98
10.1.5 Artigo Anexo V	100
10.1.6 Artigo Anexo VI	103
10.2 Escala BPRS (Brief Psychiatric Rating Scale)	105

## ABREVIATURAS E SIGLAS

AODS - Antioxidant Defense System

BPRS - Brief Psychiatry Rating Scale

CAT - Catalase

CCL-11 – Chemokine-11/Eotaxin

CCL-24 – Chemokine-24/Eotaxin-2

CP – Chronic Patients

DNA - Deoxyribonucleic Acid

DSM - Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders

DTI – Diffusion Tensor Imaging

FA – Fractional Anisotropy

GSH-PX - Glutathione Peroxidase

IL - Interleukine

NMDA - N-methyl-d-aspartate

PCC – Protein Carbonyl Content

RO – Recent Onset

SOD - Superoxide Dismutase

SCID - Structured Clinical Interview for DSM Disorders

SZ – Schizophrenia

TBARS - Thiobarbituric Acid Reactive Substances

TRAP – Total Reactive Antioxidant Potential

TNF – Tumoral Necrose Factor

VBM - Voxel-Based-Morphometry

## RESUMO

Modelos de estadiamento para transtornos mentais graves têm sido propostos para personalizar e otimizar o tratamento. A lógica do estadiamento é baseada na avaliação de cada paciente para fornecer diferentes abordagens de acordo com a patofisiologia, sintomatologia e alterações estruturais da doença. Alterações do sistema inflamatório, regulado pelas citocinas, e desequilíbrio oxidativo são cada vez mais estudados como possíveis responsáveis pela patofisiologia da esquizofrenia (SZ). O objetivo deste estudo foi investigar os níveis séricos de marcadores de estresse oxidativo e de inflamação em pacientes com início recente de doença (RO) e pacientes crônicos (CP) com SZ em remissão sintomática. Medimos dois grupos de possíveis biomarcadores séricos para estadiamento da doença: marcadores de estresse oxidativo e de defesa antioxidante (artigo 1) e marcadores inflamatórios (artigos 1 e 2). A fim de examinar os marcadores de estresse oxidativo e inflamatórios, foram selecionados vinte e dois pacientes RO (com até 10 anos de doença), trinta e nove CP (com no mínimo 10 anos de diagnóstico de SZ) e seus respectivos controles pareados. Analizamos TBARS, PCC, TRAP, IL-6, IL-10 e TNF-alfa. Encontramos aumento significativo dos níveis séricos de TBARS, IL-6 e PCC em ambos os grupos RO e CP com SZ comparados com os controles saudáveis. Não ocorreu diferença nos níveis séricos de TRAP e TNF-alfa em ambos os grupos RO e CP comparados aos seus controles. Níveis séricos de IL-10 aumentados foram encontrados no grupo CP, e ocorreu uma tendência ao aumento desta interleucina no grupo RO em comparação aos controles (artigo 1). Para caracterizar o papel das quimiocinas no curso da SZ, medimos os níveis séricos da CCL-11 (Eotaxin) e da CCL-24 (Eotaxina-2) em vinte e três pacientes RO (com até 5 anos de doença) e dezoito CP (com no mínimo 20 anos de diagnóstico de esquizofrenia) e seus respectivos controles pareados. Os níveis séricos da CCL-24 estavam significativamente aumentados nos dois grupos de pacientes comparados com os

controles. Os níveis séricos da CCL-11 não estavam diferentes nos pacientes RO, mas estavam significativamente aumentados nos CP em relação aos seus controles (artigo 2). Nossos resultados sugerem que a SZ está associada com a inflamação e que os marcadores biológicos têm níveis similares ao longo do curso da doença. Sendo assim, o conceito de estadiamento proposto para outros transtornos não é visto nesta coorte de pacientes com SZ, pelo menos para citocinas e marcadores de estresse oxidativo. Contudo, a CCL-11 parece indicar um caminho promissor na investigação de marcadores associados ao envelhecimento precoce para fins de estadiamento.

## ABSTRACT

Staging models for severe mental disorders have been proposed to personalize and optimize the treatment. The logic of staging is based on accessing each patient to provide them different approaches according to the pathophysiological, symptomatic and structural changes of the disease. Alterations on the immune system, which is regulated by cytokines, and oxidative imbalance are increasingly being studied as potentially implicated in the pathophysiology of schizophrenia (SZ). The aim of this study was to investigate serum markers of oxidative stress and inflammation in recent onset (RO) and chronic patients (CP) with SZ in symptomatic remission. We measured two groups of potential biomarkers for staging the disease: oxidative stress and antioxidant defense serum markers (article 1) and inflammatory markers (articles 1 and 2). In order to examine serum markers of oxidative stress and inflammation, we selected twenty-two RO patients (within 10 years of disease), thirty-nine CP (minimum of 10 years after the diagnosis of SZ) and their matched controls. We analyzed TBARS, PCC, TRAP, IL-6, IL-10 and TNF-alpha. We found a significant increase in serum levels of TBARS, PCC and IL-6 in both RO and CP groups with SZ compared with healthy controls. There was no difference in TRAP and TNF-alpha serum levels in both RO and CP groups compared with their controls. IL-10 levels were increased in CP group, and an increase trend in RO group was found compared with controls (article 1). In order to characterize the role of chemokines in the course of SZ, we measured serum levels of CCL-11 (Eotaxin) and CCL-24 (Eotaxin-2) in twenty-three RO patients (within first 5 years of SZ diagnosis) and nineteen CP (minimum of 20 years after the diagnosis of SZ) and their matched controls. CCL-24 serum levels were significantly increased in both groups of patients with SZ compared with controls. CCL-11 serum levels were not different in RO, but were significantly increased in CP when compared with their controls (article 2). Our results suggest that SZ is associated with

inflammation and that biological markers have similar levels throughout the course of the chronic disease. Thus, the proposed staging concept for other disorders is not seen in this cohort, at least for cytokines and oxidative stress markers. However, CCL-11 seems to indicate a promising path in the investigation of accelerated aging markers for staging.



## 1. INTRODUÇÃO

A esquizofrenia é uma doença mental complexa, crônica, incapacitante, grave e com etiologia e patofisiologia pouco definidas (1). É caracterizada por uma ampla gama de comportamentos anormais, incluindo delírios e alucinações, função cognitiva prejudicada, bem como distúrbios do humor e isolamento social (2). O transtorno tem sido observado no mundo inteiro, com prevalência na faixa de 0,3 a 0,7%, e é um dos mais importantes problemas de saúde pública do mundo, sendo classificada como a quarta principal causa de incapacidade em pessoas com idades entre 18 e 45 anos nos países desenvolvidos (1, 3, 4).

A fisiopatologia da esquizofrenia pode ser o resultado de alterações da plasticidade sináptica e das neurotrofinas com defesa antioxidante prejudicada, aumento da peroxidação lipídica e processos imunes e inflamatórios alterados, que podem estar presentes nas fases iniciais e tardias da doença (5-9).

A inflamação sistêmica crônica, existente na esquizofrenia, pode explicar o aumento de anormalidades metabólicas que ocorre nestes pacientes em relação à população geral, como diabetes, hipertensão arterial, obesidade e dislipidemia (10). Todas estas condições parecem estar subjacentes e contribuem para a patofisiologia da arteriosclerose, das doenças vasculares e de um fenótipo de envelhecimento acelerado, podendo reduzir o tempo de vida destes pacientes em cerca de 20 anos (11, 12). O encurtamento acelerado dos telômeros e a diminuição da atividade da telomerase também têm sido descritos na esquizofrenia (13-15). A presença de perda significativa do telômero neste transtorno implica em um componente de envelhecimento anormal e pode ser um marcador de traço da doença causado pelo estresse oxidativo e pela instabilidade do DNA (13, 14).

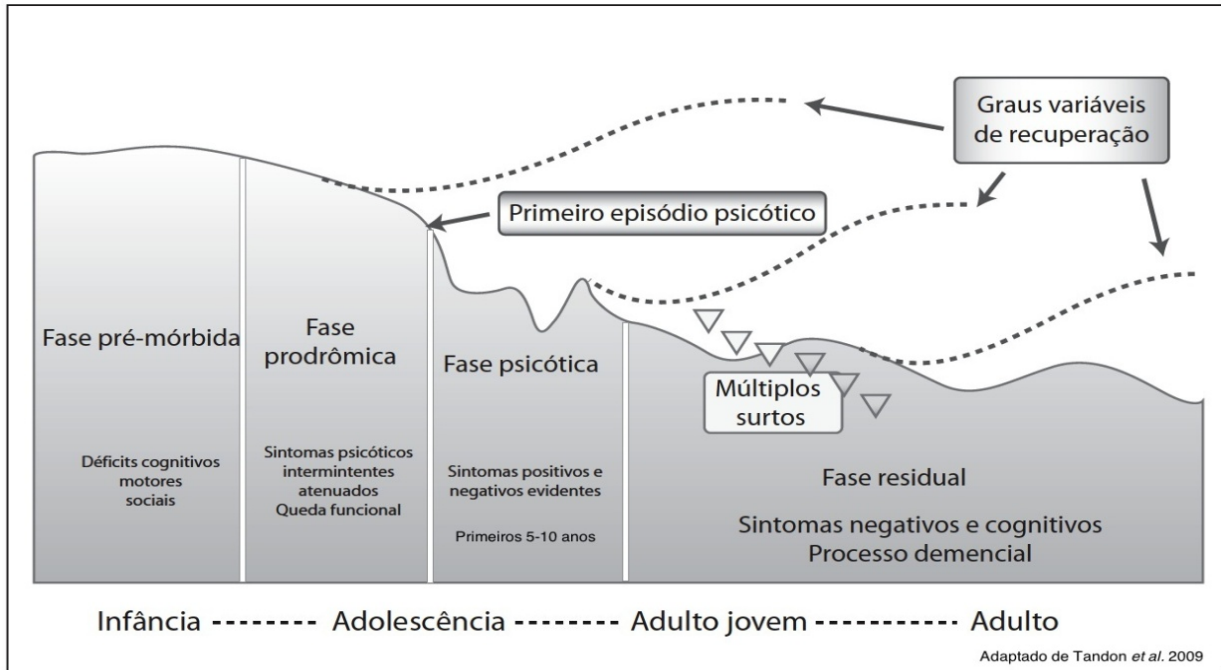
Uma nova abordagem para a compreensão dos transtornos mentais graves, tais como a esquizofrenia, é a adoção de um modelo de estadiamento clínico (16). Este modelo é particularmente útil, pois diferencia fenômenos clínicos mais leves e iniciais daqueles crônicos, que acompanham a progressão da doença (17). Além disso, o estadiamento tem a finalidade de personalizar e otimizar os tratamentos (18).

Um estudo publicado por Agius *et al.* propôs três fases do desenvolvimento da esquizofrenia: um período prodrômico, ou seja, quando os sintomas leves aumentam progressivamente em gravidade, duração e frequência, o primeiro episódio e a fase crônica da doença (19). Na primeira etapa, que é a fase do pródromo, ocorre uma perda de massa cinzenta, bem como alterações da cognição (19). A segunda fase é caracterizada pelo primeiro episódio de doença e o declínio cognitivo progressivo (19). Na terceira fase, a esquizofrenia é crônica, tendo interrupções no neuro-desenvolvimento e na plasticidade neural (19).

Segundo Lieberman (1999), a esquizofrenia apresenta um padrão único e grave de deterioração clínica no início da doença (20). Corroborando esta hipótese, estudos recentes sugerem um padrão similar de ativação imune crônica na esquizofrenia (12, 21).

Estudos que permitam avançar na compreensão do papel dos biomarcadores de traço de doença deste grupo de pacientes são da maior importância a fim de personalizar e otimizar o tratamento da esquizofrenia.

**Figura 1.** Curso da esquizofrenia.



## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 Esquizofrenia**

#### **2.1.1 Diagnóstico**

Os sintomas característicos da esquizofrenia envolvem uma variedade de disfunções cognitivas, comportamentais, e emocionais, mas nenhum único sintoma é patognomônico do transtorno (1). O diagnóstico envolve o reconhecimento de uma constelação de sinais e sintomas associados com o comprometimento do funcionamento ocupacional ou social do indivíduo (1).

Apesar dos avanços, ainda não há testes radiológicos, laboratoriais ou psicométricos sensíveis e específicos para o transtorno (1). Diferenças são evidentes em várias regiões cerebrais entre grupos de indivíduos saudáveis e pessoas com esquizofrenia, incluindo exames de neuroimagem, neuropatologia e estudos neuropsicológicos (1). Conforme assinalado por Lieberman (1999), vários achados de neuroimagem e de necrópsia, junto com a deterioração comportamental e cognitiva, que são observadas em pacientes esquizofrênicos, podem refletir um processo neurodegenerativo limitado, mas significativo, provavelmente mais ativo na fase inicial (5-10 anos) da doença (20).

Por isso, exames de neuroimagem estrutural e funcional podem ganhar um importante papel no futuro próximo (22). Estudos de neuroimagem funcional indicam alterações da ativação cerebral em tarefas, ocorrendo diminuição na região frontal e aumento em regiões cerebrais mediais nos pacientes com esquizofrenia (22). Estudos longitudinais de neuroimagem estrutural apontam para uma redução progressiva do volume de massa cinzenta em várias regiões cerebrais destes pacientes (23). Tais reduções podem caracterizar uma alteração da plasticidade sináptica, resultante do desenvolvimento anormal de circuitos neuronais, que

possivelmente estão implicados nesta doença, incluindo os circuitos do córtex dorsolateral pré-frontal e o hipocampo (23).

Além disso, sabe-se que na esquizofrenia há diminuição da substância cinzenta, principalmente no lobo frontal esquerdo, detectada por VBM (Voxel-based-morphometry) (22, 23). Outras regiões cerebrais, que foram descritas com diminuição da substância cinzenta, são o córtex límbico e para-límbico, bem como o tálamo (22, 24).

Diversos estudos com VBM também demonstraram redução da substância branca em pacientes com esquizofrenia comparados com controles (23). A distribuição das alterações na substância branca permanece incerta na esquizofrenia (24). Apesar de algumas exceções, a maioria dos estudos com DTI (Diffusion Tensor Imaging) encontraram FA (Fractional Anisotropy), medida de anisotropia, reduzidas significativamente em duas regiões: na substância branca do lobo frontal esquerdo e na substância branca profunda do lobo temporal no grupo de pacientes com a doença (23). Isto sugere que duas redes de tratos de substância branca podem estar afetadas na esquizofrenia, tendo potencial para se desconectar das regiões de substância cinzenta com as quais estão ligadas (24).

**Tabela 1.** Critérios diagnósticos da esquizofrenia segundo o DSM-V

A. No mínimo dois dos seguintes quesitos, cada qual presente persistentemente por uma porção significativa de tempo durante o período de um mês (ou menos se tratados com sucesso):

(1) delírios

(2) alucinações

(3) discurso desorganizado (p. ex., frequente descarrilamento ou incoerência)

(4) comportamento amplamente desorganizado ou catatônico

(5) sintomas negativos, isto é, embotamento afetivo, alogia ou abulia.

B. Por uma porção significativa do tempo desde o início da perturbação, uma ou mais áreas importantes do funcionamento, tais como trabalho, relações interpessoais ou cuidados pessoais, estão acentuadamente abaixo do nível alcançado antes do início (ou quando o início se dá na infância ou adolescência, incapacidade de atingir o nível esperado de alcance interpessoal, acadêmico ou ocupacional).

C. Sinais contínuos da perturbação persistem pelo período mínimo de 6 meses. Esse período de 6 meses deve incluir pelo menos um mês de sintomas (ou menos, se tratado com sucesso) que satisfazem o critério A (i.e. sintomas da fase ativa) e pode incluir períodos de sintomas prodrômicos ou residuais. Durante esses períodos prodrômicos ou residuais, os sinais da perturbação podem ser manifestados apenas por sintomas negativos ou por dois ou mais sintomas relacionados no Critério A presentes de uma forma atenuada (p. ex., crenças estranhas, experiências perceptivas incomuns).

D. O Transtorno Esquizoafetivo e a Depressão ou o Transtorno do Humor Bipolar com Características Psicóticas foram descartados, porque (1) nenhum Episódio Depressivo Maior ou Maníaco ocorreu concomitantemente aos sintomas da fase ativa; ou (2) se os episódios de humor ocorreram durante os sintomas da fase ativa, sua duração total foi breve com relação à duração dos períodos ativo e residual da doença.

E. A perturbação não se deve aos efeitos fisiológicos diretos de uma substância (p. ex., uma droga de abuso, um medicamento) ou uma condição médica geral.

F. Se existe um histórico de Transtorno do Espectro Autista ou Transtorno de Comunicação com Início na Infância, o diagnóstico adicional de Esquizofrenia é feito apenas se delírios ou alucinações proeminentes também estão presentes pelo período mínimo de 1 mês (ou menos, se tratados com sucesso).

Especificar se:

Os seguintes especificadores de curso podem ser usados somente após um ano de duração da doença e se eles não estiverem em contradição com o curso dos critérios de diagnóstico.

**Primeiro episódio, atualmente em episódio agudo:** Primeira manifestação do transtorno com a definição dos critérios diagnósticos de sintomas e tempo. Um *episódio agudo* é um período de tempo no qual os critérios de de sintomas estão preenchidos.

**Primeiro episódio, atualmente em remissão parcial:** *Remissão parcial* é um período de tempo no qual uma melhora após um episódio prévio é mantida e na qual os critérios de definição do transtorno estão somente parcialmente preenchidos.

**Primeiro episódio, atualmente em remissão completa:** *Remissão completa* é um período de tempo após um episódio prévio durante o qual nenhum sintoma específico do transtorno estão presentes.

**Episódios múltiplos, atualmente em episódio agudo:** Múltiplos episódios podem ser determinados após um mínimo de dois episódios (i.e., após um primeiro episódio, uma remissão e pelo menos um relapso).

**Episódios múltiplos, atualmente em remissão parcial**

**Episódios múltiplos, atualmente em remissão completa**

**Contínuo:** Os sintomas que preenchem os critérios diagnósticos de sintomas do transtorno permanecem pela maioria do curso da doença, com períodos de sintomas subliminares sendo muito breves em relação ao curso da doença.

**Inespecificado**

Especificar se:

**Com catatonia** (refere ao critério para catatonia associado com outro transtorno mental).

**Nota de código:** Usar código adicional 293.89 (F06.1) catatonia associada com esquizofrenia para indicar a presença de catatonia comórbida.

**Especificar gravidade atual:** Gravidade é avaliada por uma análise quantitativa dos sintomas primários de psicose, incluindo delírios, alucinações, discurso desorganizado, comportamento psicomotor anormal, e sintomas negativos. A gravidade atual de cada um desses sintomas deve ser avaliada (mais grave nos últimos 7 dias) por uma escala de 5 pontos, variando de 0 (ausente) a 4 (presente e severo).

**Nota:** O diagnóstico de esquizofrenia pode ser feito sem usar este especificador de gravidade.



### **2.1.2 Epidemiologia e Fatores de Risco para Esquizofrenia**

A prevalência da esquizofrenia ao longo da vida parece ser de aproximadamente 0.3% a 0.7%, embora ocorra variação de acordo com a raça/etnicidade, país em que o estudo foi realizado e origem geográfica de imigrantes e filhos de imigrantes (1). Estudos realizados na América Latina e Brasil apresentam médias de risco semelhantes, próximas a 1% (25).

Mulheres têm melhor funcionamento pré-mórbido, menos sintomas negativos, menos prejuízo cognitivo e melhor resposta ao tratamento, porém com sintomas afetivos mais graves (26). A proporção entre os sexos varia de acordo com as amostras e populações dos estudos (1). Por exemplo, pesquisas com ênfase em sintomas negativos e em longa duração do transtorno (associadas com pior prognóstico) apresentam maior incidência de homens, enquanto definições que permitem a inclusão de mais sintomas de humor e apresentações breves (associadas com melhor prognóstico) mostram riscos equivalentes para ambos os sexos (1). Alguns estudos indicam que os homens têm maior probabilidade de sofrer sintomas negativos do que as mulheres, e que estas têm maior probabilidade de ter melhor funcionamento social antes do início da doença (26).

A idade de início é variável e pode ocorrer entre os 15 e os 45 anos, com um pico no final da adolescência para homens, e cerca de 5 a 7 anos depois para as mulheres (26). Estas apresentam ainda um segundo pico de incidência da doença após os 40 anos de idade, incomum em homens (26).

Familiares de qualquer grau de pacientes com esquizofrenia têm risco maior de desenvolvimento da doença quando comparados com a população em geral (27, 28). Fatores genéticos têm grande importância no desenvolvimento da esquizofrenia, e estudos realizados há mais de 50 anos mostraram o componente biológico hereditário da doença (29). Estima-se que o coeficiente de herdabilidade da esquizofrenia seja cerca de 80%, o que a coloca entre as doenças com maior herdabilidade (27, 30).

Outros fatores de risco para o transtorno são: infecção e desnutrição durante a gestação, nascimento no inverno, complicações obstétricas e perinatais, uso de cannabis e idade paterna avançada (29, 31-37). Além disto, populações que vivem em áreas urbanas e imigrantes têm riscos relativos maiores de desenvolvimento da doença (38, 39).

### 2.1.3 Esquizofrenia e Cognição

As alterações cognitivas são características centrais na esquizofrenia (40). Diversos estudos vêm sendo realizados no sentido de caracterizar suas principais alterações neurocognitivas, identificar suas bases neurobiológicas e padronizar instrumentos de pesquisa, fundamentais para o advento de novos alvos para intervenções farmacológicas (40).

Pacientes com esquizofrenia apresentam disfunção cognitiva, que precede o início da doença, e que é mais pronunciada no estágio prodrômico do que no pré-mórbido, e nos primeiros anos após diagnóstico para então passar a manter um padrão estável de piora (41).

Declínio na função intelectual geral (entre as idades de 4 e 7 anos) e baixos escores, persistentemente, em testes cognitivos durante a infância precoce (idades entre 3 e 11 anos) mostram alguma especificidade para a esquizofrenia e transtornos do seu espectro, enquanto problemas emocionais e sociais parecem não ser indicadores específicos para uma variedade de desfechos psiquiátricos no adulto (42). Por estas razões, essas medidas se mostram promissoras como endofenótipos para estudos genéticos na esquizofrenia (42).

Pacientes com esquizofrenia crônica apresentam déficits cognitivos com níveis de funcionamento abaixo da média (43). O perfil neuropsicológico da esquizofrenia é tipicamente caracterizado por prejuízos específicos na memória e aprendizado, memória de trabalho, funções executivas, atenção e velocidade de processamento (44).

Conforme descrito por Zanello *et al.* (2009), não há diferença entre a memória de trabalho de pacientes com primeiro episódio de esquizofrenia e pacientes com a doença em estágio crônico, sugerindo a estabilidade da disfunção cognitiva ao longo do transtorno (45). Este achado é corroborado por um estudo realizado por Spoheim *et al.* (2010), que encontrou prejuízos cognitivos comparáveis no curso da esquizofrenia, desde o estágio precoce até a sua fase crônica (46).

#### **2.1.4 Aspectos Neurobiológicos da Esquizofrenia**

Estudos mostram que a esquizofrenia é uma doença poligênica e sugerem que a inter-relação complexa de diversas variações genéticas, que sozinhas têm pequeno efeito, contribuem significativamente para o desenvolvimento do transtorno (47, 48).

Recentes teorias convergem para um conceito global, o da esquizofrenia como uma patologia neurodesenvolvimental (49). Segundo essa teoria, as alterações responsáveis pelos sintomas da doença acontecem durante o desenvolvimento do sistema nervoso central (49). Portanto, a esquizofrenia seria causada por alterações cerebrais determinadas por uma combinação de fatores genéticos e/ou ambientais iniciais e que eventualmente interagem com o processo de maturação normal do cérebro para facilitar sintomas como a psicose (49). Sugere-se que durante o período da adolescência, quando o córtex pré-frontal ainda não está completamente desenvolvido, ocorra uma falha na poda das sinapses excitatórias e na proliferação de circuitos inibitórios, em especial nos circuitos dopaminérgicos, que parecem ter relação com o episódio psicótico (50).

A patofisiologia da esquizofrenia pode ser resultante de uma desregulação na plasticidade sináptica, com alterações de neurotrofinas, radicais livres e processos inflamatórios (51, 52). Existe uma larga evidência de que os radicais livres podem ter um papel importante na patofisiologia da esquizofrenia, induzindo danos na membrana celular, em proteínas e no DNA (6, 8). Alterações na defesa antioxidante e aumento da peroxidação lipídica foram descritos em pacientes com esquizofrenia em primeiro episódio, virgens de tratamento (51, 53, 54) e naqueles cronicamente medicados (6, 8, 9).

As formulações das teorias neuroquímicas para a esquizofrenia adotaram um modelo fisiopatológico em que as alterações de um sistema neurotransmissor específico seriam responsáveis pelo quadro clínico dos pacientes (49). Cada vez mais, no entanto, as relações entre os sistemas de transmissão têm sido levadas em conta para a formulação de modelos mais complexos da doença (49). Embora existam várias hipóteses bioquímicas desenvolvidas

para explicar a gênese da esquizofrenia, a hiperfunção dopaminérgica central, atualmente, é a mais bem investigada e mais aceita (49). No entanto, sabe-se que, além do sistema dopaminérgico, outros sistemas de neurotransmissores centrais desempenham algum papel, sendo provável que vários deles estejam envolvidos simultaneamente (55).

As principais projeções dopaminérgicas são divididas em nigroestriatal, mesolímbica e mesocortical (56). A via nigroestriatal projeta-se da substância nigra para o estriato dorsal e está classicamente envolvida na integração cognitiva, habituação, coordenação sensório-motora e iniciação dos movimentos (56). A via mesolímbica projeta-se da área tegmental-ventral para estruturas límbicas como o estriato ventral (núcleo accumbens e porção ventral do caudado e putâmen), o hipocampo e a amígdala (56). A via mesocortical projeta-se da área tegmental-ventral para regiões corticais, especialmente orbitofrontal, pré-frontal medial e cingulado, mas também córtex pré-frontal dorso-lateral, temporal e parietal (56). Os sistemas mesolímbicos e mesocortical estão envolvidos na motivação, atenção, recompensa e agressividade (56).

A hipótese dopaminérgica foi desenvolvida a partir da observação de que a anfetamina, um agonista dopaminérgico indireto, é capaz de induzir sintomas psicóticos em pessoas saudáveis e exacerbar alucinações, delírios e distúrbios do pensamento em pacientes com esquizofrenia (57, 58). Uma recente revisão sobre a natureza da dopamina e sua disfunção na esquizofrenia incluiu 44 estudos de imagem molecular, que mediram a função dopaminérgica estriatal *in vivo* (59). O resultado mostrou que pacientes com esquizofrenia apresentam aumento dopaminérgico pré-sináptico com um grande tamanho de efeito neste achado (59). Outro recente estudo com imagem molecular, que avaliou a função dopaminérgica pré-sináptica estriatal em pacientes em pródromos para a esquizofrenia, encontrou resultados semelhantes e corroboram os achados anteriores dos mesmos autores (60). Esses estudos dão suporte à hipótese de uma disfunção dopaminérgica na esquizofrenia (59).

Os receptores D2 estão localizados principalmente em regiões subcorticais, como estriado e acumbens, regiões em que a hiperatividade dopaminérgica parece ser responsável pelos sintomas positivos (58). Por outro lado, os sintomas negativos da doença estariam associados a um estado hipodopaminérgico no córtex frontal e não seriam tratados a partir do bloqueio D2 (58).

A hipótese glutamatérgica surgiu pelo fato de que o uso de antagonistas do receptor glutamatérgico NMDA (N-methyl-d-aspartate), como o PCP e a quetamina, podem levar a sintomas negativos e cognitivos semelhantes aos da esquizofrenia (61, 62). Além disso, agonistas glutamatérgicos têm se mostrado promissores no tratamento de alguns sintomas da doença (61, 63).

## 2.2 Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo se estabelece quando ocorre um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio e a capacidade do organismo de inativá-las ou de reparar os danos produzidos pelas mesmas (65). Nestas condições, os radicais livres, espécies altamente reativas, que possuem um ou mais elétrons desemparelhados no seu orbital externo, são produzidos em excesso e reagem com carboidratos, proteínas, DNA e lipídeos (65). O radical livre mais comum é chamado superóxido ( $O_2^-$ ), sendo produzido quando a molécula de oxigênio ganha um elétron de outra substância (65). Durante o processo metabólico normal envolvendo o oxigênio, os radicais livres são produzidos, atuando como agentes pró-oxidantes e podendo causar danos a lipídios, proteínas e DNA, danos esses chamados de estresse oxidativo (65, 66).

Existem diversas evidências mostrando o envolvimento dos radicais livres em diversas patologias, especialmente nos transtornos neurológicos e psiquiátricos devido à vulnerabilidade do sistema nervoso central ao estresse oxidativo (66). O estresse oxidativo aumentado em nível neuronal produz efeitos deletérios sobre a transdução de sinal, a plasticidade e a resistência estrutural celular, principalmente por indução da peroxidação lipídica em membranas e pelos danos diretos em proteínas e genes (7-9). Além disso, o sistema nervoso central é suscetível a danos oxidativos, pois apresenta grande atividade energética mitocondrial dependente de oxigênio, que está associada à elevada concentração de ferro livre e lipídeos poli-insaturados e a baixos níveis de glutathione e enzimas antioxidantes (67).

O estresse oxidativo tem sido identificado como um possível elemento no processo neuropatológico da esquizofrenia devido ao aumento da peroxidação de lipídios e proteínas no início da psicose em pacientes nunca medicados (6, 8, 9, 56, 68-70). Diversos mecanismos fisiopatológicos têm sido relacionados como possíveis fatores para a elevação do estresse oxidativo nesta doença, dentre eles, fatores genéticos, disfunções no metabolismo mitocondrial e aumento da liberação da dopamina em regiões estriatais (65, 71,72).

Alguns marcadores biológicos têm sido utilizados para medir os danos causados pela oxidação, dentre eles o TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances) para os produtos resultantes da peroxidação lipídica ou peróxidos de lipídeos plasmáticos capazes de reagir com o ácido tiobarbitúrico, e o PCC (Protein Carbonyl Contents) para proteínas (6, 73).

O TBARS é um dos produtos secundários da peroxidação lipídica mais conhecidos e foi utilizado como um indicador do dano oxidativo para várias doenças (6, 8). Através do aumento do TBARS, os radicais livres gerados pelo estresse oxidativo interagem com proteínas associadas à membrana celular, alterando o funcionamento de neurotransmissores, enzimas e segundos-mensageiros, descritos em ampla variedade de doenças neurológicas e psiquiátricas (6, 8, 53, 74).

Uma meta-análise sobre marcadores de estresse oxidativo na esquizofrenia, realizada por Zhang *et al.* (2010), apresentou níveis séricos de TBARS significativamente aumentados nesta doença comparados a controles saudáveis (74). Níveis séricos elevados de TBARS, encontrados em pacientes com esquizofrenia cronicamente medicados comparados com controles, fornecem evidência do aumento da peroxidação lipídica por estresse oxidativo neste transtorno (6, 8, 9). Esse dano mostrou-se maior nos pacientes que faziam uso de clozapina quando comparados com pacientes em uso de haloperidol (6). Estudos anteriores mostraram um aumento dos níveis séricos de TBARS, predominantemente em pacientes com esquizofrenia virgens de tratamento, em relação aos controles (56,75).

O principal mecanismo molecular induzido pelo estresse oxidativo é a oxidação de proteínas (6, 8, 9). As mudanças estruturais causadas por estresse oxidativo nas proteínas são caracterizadas pela formação de carbonil (76). Sendo assim, a dosagem de PCC indica o nível de estresse oxidativo (79). Dietrich-Muszalska & Olas (2009) mostraram um aumento estatisticamente significativo do nível de biomarcadores de estresse oxidativo, como o PCC em proteínas de plaquetas de pacientes com esquizofrenia comparados com controles saudáveis



(77). Massuda, Pedrini (2013) em um recente estudo que selecionou 37 irmãos de pacientes com esquizofrenia e 37 controles saudáveis, encontraram um aumento significativo dos níveis de PCC nos irmãos saudáveis de pacientes com esquizofrenia, comparando com controles saudáveis, fornecendo evidências adicionais de que o aumento do estresse oxidativo pode ser um endofenótipo relacionado à fisiopatologia da doença (78).

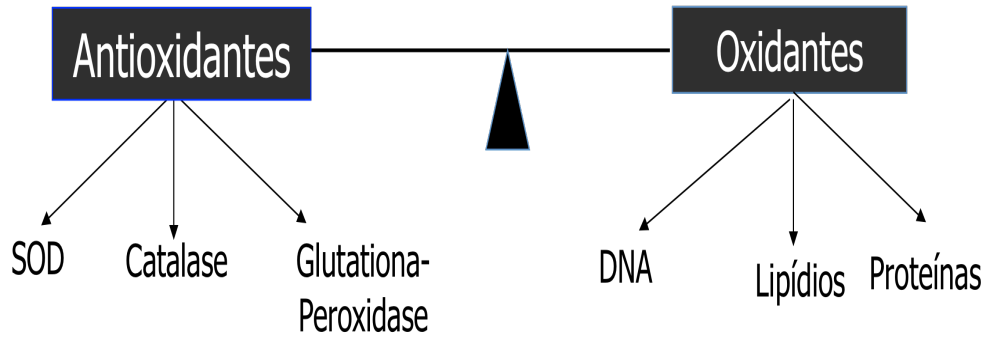
Os sistemas biológicos possuem estratégias complexas para proteger o organismo contra a toxicidade dos radicais livres, através de diversos componentes enzimáticos e não enzimáticos, denominados AODS (Antioxidant Defense System) (51). Os componentes enzimáticos dos AODS são predominantemente representados pelas enzimas: SOD (Superoxide Dismutase), CAT (Catalase) e GSH-PX (Glutathione peroxidase) (51). Além disso, a dosagem sérica de TRAP (Total Reactive Antioxidant Potential) é um dos métodos mais utilizados para avaliar a capacidade antioxidante de amostras *in vitro* (79, 80).

Os antioxidantes reduzem a extensão da peroxidação lipídica (80). As enzimas de defesa contra agentes pró-oxidantes agem de maneira cooperativa e integrada em diferentes fases do metabolismo dos radicais livres, prevenindo os potenciais danos causados por eles (51). A relação entre agentes pró-oxidantes e antioxidantes se dá como uma balança, que em processos patológicos pode estar desequilibrada e, conseqüentemente, agindo na disfunção e morte celular (6, 64).

A SOD é a enzima antioxidante mais frequentemente estudada e a mais amplamente distribuída no cérebro (6). Gama *et al.* (2006) encontraram níveis da SOD similares nos pacientes com esquizofrenia comparados com controles (6). Um estudo publicado por Raffa *et al.* (2011) apresentou aumento da GSH-PX em pacientes em primeiro episódio psicótico, não medicados, comparados a controles saudáveis (81). Não ocorreu diferença nos níveis séricos da SOD, e os níveis séricos da CAT estavam diminuídos nos pacientes em relação aos controles neste mesmo estudo (81).

Recentemente, novas pesquisas estão sendo realizadas com o uso de terapia com ômega 3, um conhecido antioxidante, em pacientes em risco para o desenvolvimento da esquizofrenia (83, 84). Um estudo com modelo animal e um ensaio clínico randomizado demonstraram a possibilidade do uso de ômega 3 como protetor contra o desenvolvimento da doença (83, 84).

**Figura 2.** Equilíbrio entre agentes oxidantes e antioxidantes.



### 2.3 Citocinas

As citocinas são proteínas ou glicoproteínas envolvidas no desenvolvimento, coordenação e supressão das respostas imunológicas e execução de ações neuromodulatórias, responsáveis pela emissão de sinais entre as células durante o desencadeamento das respostas imunes (21). Existem mais de 100 citocinas identificadas, formando uma super-família, que engloba IL (interleucinas), quimiocinas, interferonas, fatores estimuladores de colônia, fatores de crescimento e TNFs (Tumor Necrose Factor) (85). São responsáveis pela coordenação do sistema imunológico inato e adaptativo e têm um papel importante na relação entre o sistema nervoso central e o sistema imune, o que pode ter implicações para a clínica na psiquiatria (66, 84-86).

De acordo com suas ações, as citocinas podem ser pró-inflamatórias ou anti-inflamatórias. As citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, TNF-alfa e IFN) levam à ativação dos macrófagos, células NK, células T e células B e proliferação de imunoglobulinas (87). As citocinas anti-inflamatórias (IL-4, IL-10, IL-13, TGF-beta) reduzem a resposta inflamatória por meio da diminuição das citocinas pró-inflamatórias e da supressão de monócitos (87, 88).

A inflamação tem sido fortemente implicada nos mecanismos fisiopatológicos e etiológicos da esquizofrenia. (12, 21, 51, 89-97). Além disso, dados da literatura mostram que ocorre um estado inflamatório hiper-regulado nas fases precoce e tardia da esquizofrenia (5-9).

Um dos achados mais robustos na pesquisa dos marcadores inflamatórios na esquizofrenia é o nível sérico elevado da IL-6, como foi evidenciado por um meta-análise que incluiu 19 estudos e 1219 pacientes (88, 95). Um recente estudo mostrou que os pacientes com primeiro episódio de psicose tinham níveis elevados de IL-6, assim como hiper-expressão do seu gene, quando comparados aos controles, sugerindo um estado pró-inflamatório, associado

com níveis reduzidos de BDNF e com um menor volume de hipocampo (98). Uma meta-análise a respeito das citocinas na esquizofrenia, realizada por Miller *et al.* (2011), também encontrou níveis aumentados de IL-6 em pacientes com esquizofrenia com sintomas agudos quando comparados aos controles (21).

Kunz *et al.* (2011) analisaram várias citocinas inflamatórias em 20 pacientes bipolares eutímicos, 53 pacientes com esquizofrenia cronicamente estabilizados e 80 controles saudáveis (12). Os resultados evidenciaram uma ativação imune crônica na esquizofrenia: níveis séricos de IL-6 aumentados nos pacientes com esta doença quando comparados aos controles e aos pacientes bipolares eutímicos; níveis de IL-10 diminuídos nos controles quando comparados aos pacientes com esquizofrenia ou aos bipolares; níveis séricos de TNF-alfa similares entre os grupos (12). Concluiu-se, neste estudo, que os níveis séricos aumentados de IL-10 no transtorno bipolar e na esquizofrenia sugerem diferentes padrões de equilíbrio inflamatório entre esses dois transtornos (12).

Uma recente meta-análise mostrou, em seus resultados, a presença de níveis sanguíneos de IL-10 significativamente diminuídos em pacientes com esquizofrenia com sintomatologia aguda em relação aos controles (21). Além disso, recentes estudos não encontraram níveis de TNF-alfa significativamente diferentes ao comparar pacientes com esquizofrenia e controles (97).

Outro tipo de citocinas, as quimiocinas, ou citocinas quimiotáticas, são proteínas classicamente definidas pela sua capacidade para dirigir o movimento de circulação de leucócitos para os locais de inflamação ou lesão (99-102). Elas têm sido implicadas não só no recrutamento de leucócitos, mas também na apoptose, angiogênese, e neurogênese (102). Aproximadamente 50 diferentes tipos de quimiocinas humanas foram descritas e interagem com os 18 diferentes receptores (103). A ligação de uma quimiocina ao seu receptor ativa uma cascata de sinalização, que resulta em aumento das concentrações de cálcio e ativação de

proteínas quinases ativadas por mitógenos, um mecanismo importante para a plasticidade sináptica (101, 104).

Conforme sugerido por Fernandez-Egea *et al.* (2013), a CCL-11 aumenta com a idade nos seres humanos e roedores, podendo servir como um biomarcador periférico para a neurogênese (105). As quimiocinas parecem desempenhar um papel crucial na neurodegeneração, uma vez que a maioria das doenças neurodegenerativas são acompanhadas por um aumento da sua expressão (99, 103, 106). Também, foi sugerida a associação das quimiocinas com diversos transtornos psiquiátricos e com o envelhecimento acelerado (88, 107).

Em relação à esquizofrenia, estudos mostraram um aumento dos níveis séricos de CCL-2/MCP-1, CCL-3/MIP-1, CXCL-8/IL-8, RANTES e CCL-22 em pacientes com a doença comparados com controles (91,108). Recentemente, foi encontrado aumento dos níveis de CCL-11 em pacientes com esquizofrenia em relação aos controles saudáveis (85, 109). No entanto, não ocorreu diferença dos níveis séricos da CCL-24 em indivíduos com esquizofrenia (85, 109).

Ambas as quimiocinas CCL-11 e CCL-24 agem sobre o receptor CCR-3, expresso preferencialmente em eosinófilos, mastócitos e linfócitos Th2 (102). Níveis séricos elevados de CCL-11 e CCL-24 em pacientes com esquizofrenia são consistentes com a ideia de que a ativação preferencial de linfócitos Th2 desempenha um papel importante na sua patogênese, além de corroborar a teoria de que a esquizofrenia está associada a um desequilíbrio da resposta imunológica Th1/Th2 com um desvio no sentido de Th2 (21, 85, 88, 109).

**Figura 3.** Marcadores inflamatórios.



## REFERÊNCIAS

1. American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders: 5<sup>th</sup> Ed. (DSM-V). Washington, DC: American Psychiatric Association press, 2013.
2. Chew LJ, Fusar-Poli P, Schmitz T. Oligodendroglial alterations and the role of microglia in white matter injury: relevance to schizophrenia. *Developmental Neuroscience* 2013, 35(2-3):102-29.
3. Andreasen NC, Nopoulos P, Magnotta V, Pierson R, Ziebell S, Ho BC. Progressive brain change in schizophrenia: a prospective longitudinal study of first-episode schizophrenia. *Biological Psychiatry* 2011, 70(7):672-9.
4. Yao JK, Reddy RD, van Kammen DP. Oxidative damage and schizophrenia: an overview of the evidence and its therapeutic implications. *CNS Drugs* 2001, 15(4):287e310.
5. Ng F, Berk M, Dean O, Bush AI. Oxidative stress in psychiatric disorders: evidence base and therapeutic implications. *International Journal of Neuropsychopharmacology* 2008, 11(6):851e76.
6. Gama CS, Salvador M, Andreazza AC, Kapczinski F, Belmonte-de-Abreu PS. Elevated serum superoxide dismutase and thiobarbituric acid reactive substances in schizophrenia: a study of patients treated with haloperidol or clozapine. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 2006, 30(3): 512e5.
7. Gama CS, Andreazza AC, Kunz M, Berk M, Belmonte-de-Abreu PS, Kapczinski F. Serum levels of brain-derived neurotrophic factor in patients with schizophrenia and bipolar disorder. *Neuroscience Letters* 2007, 420(1): 45e8.



8. Gama CS, Berk M, Andreazza AC, Kapczinski F, Belmonte-de-Abreu P. Serum levels of brain-derived neurotrophic factor and thiobarbituric acid reactive substances in chronically medicated schizophrenic patients: a positive correlation. *Revista Brasileira de Psiquiatria* 2008, 30(4):337e40.
9. Gama CS, Salvador M, Andreazza AC, Lobato MI, Berk M, Kapczinski F, et al. Elevated serum thiobarbituric acid reactive substances in clinically symptomatic schizophrenic males. *Neuroscience Letters* 2008, 433(3):270e3.
10. Mansur RB, Zugman A, Asevedo EM, da Cunha GR, Bressan RA, Brietzke E. Cytokines in schizophrenia: possible role of anti-inflammatory medications in clinical and preclinical stages. *Psychiatry Clinical Neuroscience* 2012, 66(4):247-60.
11. Thakore JH. Metabolic disturbance in first-episode schizophrenia. *The British Journal of Psychiatry Supplement* 2004, 47:S76-79.
12. Kunz M, Ceresér KM, Goi PD, Fries GR, Teixeira AL, Fernandes BS, et al. Serum levels of IL-6, IL-10 and TNF- $\alpha$  in patients with bipolar disorder and schizophrenia: differences in pro- and anti-inflammatory balance. *Revista Brasileira de Psiquiatria* 2011, 33(3):268e74.
13. Kao H-T, Cawthon RM, DeLisi LE, Bertisch HC, Ji F, Gordon D, et al. Rapid telomere erosion in schizophrenia. *Molecular Psychiatry* 2008, 13, 118–119.
14. Porton B, Delisi LE, Bertisch HC, Ji F, Gordon D, Li P, Benedict MM, Greenberg WM, Kao HT. Telomerase levels in schizophrenia: a preliminary study. *Schizophrenia Research* 2008, 106(2-3):242-7.
15. Yu WY, Chang HW, Lin CH, Cho CL. Short telomeres in patients with chronic schizophrenia who show a poor response to treatment. *Journal of Psychiatry and Neuroscience* 2008, 33(3):244-7.

16. Wood SJ, Yung AR, McGorry PD, Pantelis C. Neuroimaging and treatment evidence for clinical staging in psychotic disorders: from the at-risk mental state to chronic schizophrenia. *Biological Psychiatry* 2011, 70(7):619-25.
17. McGorry PD, Nelson B, Goldstone S, Yung AR. Clinical staging: a heuristic and practical strategy for new research and better health and social outcomes for psychotic and related mood disorders. *Canadian Journal of Psychiatry* 2010, 55(8):486e97.
18. Berk M, Malhi GS, Hallam K, Gama CS, Dodd S, Andreazza AC, et al. Early intervention in bipolar disorders: clinical, biochemical and neuroimaging imperatives. *Journal of Affective Disorders* 2009, 114(1-3):1-13.
19. Agius M, Goh C, Ulhaq S, McGorry P. The staging model in schizophrenia, and its clinical implications. *Psychiatria Danubina* 2010, 22(2):211e20.
20. Lieberman JA. Pathophysiologic mechanisms in the pathogenesis and clinical course of schizophrenia. *Journal of Clinical Psychiatry* 1999, 60 (Suppl. 12):9e12.
21. Miller BJ, Buckley P, Seabolt W, Mellor A, Kirkpatrick B. Meta-analysis of cytokine alterations in schizophrenia: clinical status and antipsychotic effects. *Biological Psychiatry* 2011, 70(7):663e71.
22. Mueller S, Keeser D, Reiser MF, Teipel S, Meindl T. Functional and Structural MR Imaging in Neuropsychiatric Disorders, Part 2: Application in Schizophrenia and Autism. *American Journal of Neuroradiology* 2012 Dec;33(11):2033-7
23. Meyer-Lindenberg A, Tost H. Neuroimaging and plasticity in schizophrenia, *Restorative Neurology and Neuroscience* 2013 Jul 31. [Epub ahead of print].

24. Ellison-Wright I, Bullmore E. Meta-analysis of diffusion tensor imaging studies in schizophrenia. *Schizophrenia Research* 2009, 108(1-3):3-10.
25. Mari JJ, Leitão RJ. A epidemiologia da esquizofrenia. *Revista Brasileira de Psiquiatria* 2000, 22:15-7.
26. Sadock BJ, Sadock VA. *Manual Conciso de Psiquiatria Clínica*. 2 ed. Porto Alegre: artemed, 2004. p154-74.
27. Gottesman, II, Erlenmeyer-Kimling L. Family and twin strategies as a head start in defining prodromes and endophenotypes for hypothetical early-interventions in schizophrenia. *Schizophrenia Research* 2001, 1;51(1):93-102.
28. Gottesman, II, Gould TD. The endophenotype concept in psychiatry: etymology and strategic intentions. *The American Journal of Psychiatry* 2003, 160(4):636-45.
29. Tandon R, Keshavan MS, Nasrallah HA. Schizophrenia, "just the facts" what we know in 2008. 2. Epidemiology and etiology. *Schizophrenia Research* 2008,102(1-3):1-18.
30. Gejman PV, Sanders AR, Kendler KS. Genetics of schizophrenia: new findings and challenges. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 2011, 22;12:121-44.
31. Penner JD, Brown AS. Prenatal infectious and nutritional factors and risk of adult schizophrenia. *Expert review of neurotherapeutics* 2007, 7(7):797-805.
32. Byrne M, Agerbo E, Bennedsen B, Eaton WW, Mortensen PB. Obstetric conditions and risk of first admission with schizophrenia: a Danish national register based study. *Schizophrenia research* 2007, 97(1-3):51-9.
33. Ballon JS, Dean KA, Cadenhead KS. Obstetrical complications in people at risk for developing schizophrenia. *Schizophrenia research* 2008, 98(1-3):307-11.

34. Mittal VA, Ellman LM, Cannon TD. Gene-environment interaction and covariation in schizophrenia: the role of obstetric complications. *Schizophrenia bulletin* 2008, 34(6):1083-94.
35. Henquet C, Murray R, Linszen D, van Os J. The environment and schizophrenia: the role of cannabis use. *Schizophrenia bulletin* 2005, 31(3):608- 12.
36. Wohl M, Gorwood P. Paternal ages below or above 35 years old are associated with a different risk of schizophrenia in the offspring. *European psychiatry : the journal of the Association of European Psychiatrists* 2007, 22(1):22-6.
37. Petersen L, Mortensen PB, Pedersen CB. Paternal age at birth of first child and risk of schizophrenia. *The American journal of psychiatry* 2011, 168(1):82-8.
38. Cantor-Graae E, Selten JP. Schizophrenia and migration: a meta-analysis and review. *The American journal of psychiatry* 2005, 162(1):12-24.
39. Krabbendam L, van Os J. Schizophrenia and urbanicity: a major environmental influence--conditional on genetic risk. *Schizophrenia bulletin* 2005, 31(4):795-9.
40. Ferreira Junior BC, Barbosa MA, Barbosa IG, Hara C, Rocha FL. Alterações cognitivas na esquizofrenia: atualização. *Revista de Psiquiatria do Rio Grande do Sul* 2010, 32(2):57-63.
41. Lewandowski K.E., B. M. Cohen and D. Ongur. Evolution of neuropsychological dysfunction during the course of schizophrenia and bipolar disorder. *Psychological Medicine* 2011, 41, 225–241.
42. Rapoport JL, Addington A, Frangou S. The neurodevelopmental model of schizophrenia: what can very early onset cases tell us?. *Current Psychiatry Reports* 2005, 7 (2): 81-2

43. Carlino D, Leone E, Di Cola F, Baj G, Marin R, Dinelli G, Tongiorgi E, De Vanna M. Low serumtruncated-BDNF isoform correlates with higher cognitive impairment in schizophrenia. *Journal of Psychiatric Research* 2011, 45(2):273-9.
44. Reichenberg A. The assessment of neuropsychological functioning in schizophrenia. *Dialogues in Clinical Neuroscience* 2010, 12(3): 383-92.
45. Zanello A, Curtis L, Badan Bâ M, Merlo MC. Working memory impairments in first-episode psychosis and chronic schizophrenia. *Psychiatry Research* 2009, 30;165(1-2):10-8.
46. Sponheim SR, Jung RE, Seidman LJ, Mesholam-Gately RI, Manoach DS, O'Leary DS, et al. Cognitive deficits in recent-onset and chronic schizophrenia. *Journal of Psychiatric Research* 2010, 44(7):421-8.
47. Kim Y, Zerwas S, Trace SE, Sullivan PF. Schizophrenia genetics: where next? *Schizophrenia bulletin* 2011, 37(3):456-63.
48. Corvin A. Schizophrenia at a Genetics Crossroads: Where to Now? *Schizophrenia bulletin* 2013, 1;39(3):490-5.
49. Lara D, Gama, CS, Abreu, PB. Esquizofrenia. In: Kapczinski F; Quevedo, J; Isquierdo, I. *Bases Biológicas dos Transtornos Psiquiátricos*. 2 ed. Porto Alegre: artemed, 2004. p 285-297.
50. Howes OD, Kambeitz J, Kim E, Stahl D, Slifstein M, Abi-Dargham A, et al. The nature of dopamine dysfunction in schizophrenia and what this means for treatment. *Archives of General Psychiatry* 2012, 69(8):776-86.
51. Reddy RD, Yao JK. Free radical pathology in schizophrenia: a review. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 1996, 45:43-49.

52. Gratacos M, Gonzalez JR, Mercader JM, Cid RD, Urretavizcaya M, Estivill X. Brain-Derived Neurotrophic Factor Val66Met and Psychiatric Disorders: Meta- Analysis of Case-Control Studies Confirm Association to Substance-Related Disorders, Eating Disorders, and Schizophrenia. *Biological Psychiatry* 2007, 61 (6): 911-922.
53. Arvindakshan M, Sitasawad S, Debsikdar V, Ghate M, Evans D, Horrobin DF, et al.. Essential polyunsaturated fatty acid and lipid peroxide levels in never-medicated and medicated schizophrenia patients. *Biological Psychiatry* 2003, 53(1):56-64.
54. Khan MM, Evans DR, Gunna V, Scheffer RE, Mahadik SP. Reduced erythrocyte membrane essential fatty acids and increased lipid peroxides in schizophrenic patients at the never-medicated first episode of psychosis and after years of treatment with antipsychotics. *Schizophrenia Research* 2002, 58(1):1-10.
55. Lieberman JA, Mailman RB, Duncan G et al. Serotonergic basis of antipsychotic drug effects in schizophrenia. *Biological Psychiatry* 1998, 44: 1099-177.
56. Stahl SM. *Stahl's Essential Psychopharmacology. Neuroscientific Basis and Practical Applications*. 3ed. Cambridge University Press, New York, 2008.
57. Laruelle M, Abi-Dargham A, Van Dyck CH, Gil R, D'Souza CD, Erdos J, et al. Single-photon emission computerized tomography imaging of amphetamine- induced dopamine release in drug-free schizophrenic subjects. *PNAS* 1996, 93: 9235-9240.
58. Abi-Dargham A, Laruelle M. Mechanisms of action of second generation antipsychotic drugs in schizophrenia: insights from brain imaging studies. *European Psychiatry* 2005, 20: 15-27.
59. Howes OD, Kambeitz J, Kim E, Stahl D, Slifstein M, Abi-Dargham A, et al. The nature of dopamine dysfunction in schizophrenia and what this means for treatment. *Archives of general Psychiatry* 2012, 69(8):776-86.

60. Egerton A, Chaddock CA, Winton-Brown TT, Bloomfield MA, Bhattacharyya S, Allen P, et al. Presynaptic Striatal Dopamine Dysfunction in People at Ultra-high Risk for Psychosis: Findings in a Second Cohort. *Biological Psychiatry* 2013,15;74(2):106-12.
61. Kantrowitz JT, Javitt DC. N-methyl-d-aspartate (NMDA) receptor dysfunction or dysregulation: The final common pathway on the road to schizophrenia? *Brain Research Bulletin* 2010, 83:108–121.
62. Moghaddam B, Javitt D. From revolution to evolution: the glutamate hypothesis of schizophrenia and its implication for treatment. *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 2012, 37(1):4-15.
63. Gama CS, Lucena DD, Cruz C, Lobato MI, Belmonte-de-Abreu PS. Improvement of schizophrenia negative and positive symptoms with amantadine as add-on therapy to antipsychotics: a case series. *Revista Brasileira de Psiquiatria* 2010, 32(2):193-4.
64. Andrezza AC. Combining redox-proteomics and epigenomics to explain the involvement of oxidative stress in psychiatric disorders. *Molecular BioSystems* 2012, 8(10):2503-12.
65. Yao JK, Keshavan MS. Antioxidants, redox signaling, and pathophysiology in schizophrenia: an integrative view. *Antioxidants & redox signaling* 2011,1;15(7):2011-35.
66. Kapczinski F, Dal-Pizzol F, Teixeira AL, Magalhaes PV, Kauer-Sant'Anna M, Klamt F, et al. Peripheral biomarkers and illness activity in bipolar disorder. *Journal of Psychiatric Research* 2011, 45(2):156-61.
67. Coskun S, Gonul B, Guzel NA, Balabanlı B. The effects of vitamin C supplementation on oxidative stress and antioxidant content in the brains of chronically exercised rats. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2005, 280 (1-2): 135-8.

68. Riegel RE, Valvassori SS, Moretti M, Ferreira CL, Steckert AV, de Souza B, et al. Intracerebroventricular ouabain administration induces oxidative stress in the rat brain. *International Journal of Developmental Neuroscience* 2010, 28(3):233-7.
69. Dietrich-Muszalska A, Kontek B. Lipid peroxidation in patients with schizophrenia. *Psychiatry and Clinical Neurosciences* 2010, 64(5):469-75.
70. Kunz M, Gama CS, Andreazza AC, Salvador M, Ceresér KM, Gomes FA, et al. Elevated serum superoxide dismutase and thiobarbituric acid reactive substances in different phases of bipolar disorder and in schizophrenia. *Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry* 2008, 32(7):1677-81,
71. Chowdari KV, Bamne MN, Nimgaonkar VL. Genetic association studies of antioxidant pathway genes and schizophrenia. *Antioxidants & redox signaling* 2011, 1;15(7):2037-45.
72. Paulsen Bda S, de Moraes Maciel R, Galina A, Souza da Silveira M, dos Santos Souza C, Drummond H, et al. Altered oxygen metabolism associated to neurogenesis of induced pluripotent stem cells derived from a schizophrenic patient. *Cell transplantation* 2012, 21(7):1547-59.
73. Chevion M, Berenshtein E, Stadtman ER. Human studies related to protein oxidation: protein carbonyl content as a marker of damage. *Free radical research* 2000, 33 Suppl:S99-108.
74. Zhang M, Zhao Z, He L, Wan C. A meta-analysis of oxidative stress markers in schizophrenia. *Science China Life Sciences* 2010, 53(1):112-24.
75. Grignon S, Chianetta JM. Assessment of malondialdehyde levels in schizophrenia: a meta-analysis and some methodological considerations. *Progress in Neuropsychopharmacology Biological Psychiatry* 2007, 30;31(2):365-9.



76. Dietrich-Muszalska A, Olas B, Głowacki R, Bald E. Oxidative/nitrative modifications of plasma proteins and thiols from patients with schizophrenia. *Neuropsychobiology* 2009, 59(1):1-7.
77. Dietrich-Muszalska A, Olas B. Modifications of blood platelet proteins of patients with schizophrenia *Platelets* 2009, 20(2):90-6.
78. Massuda R, Pedrini M, Reckziegel R, Costanzi M, Ferrari P, Gubert C, Gama CS. Elevated serum protein oxidative stress in siblings of patients with schizophrenia. *Schizophrenia Research* 2013 Jul;147(2-3):398-9.
79. Dresch MT, Rossato SB, Kappel VD, Biegelmeyer R, Hoff ML, Mayorga P, et al. Optimization and validation of an alternative method to evaluate total reactive antioxidant potential. *Analytical Biochemistry* 2009, 385(1):107-14.
80. Wayner DD, Burton GW, Ingold KU, Locke S. Quantitative measurement of the total, peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation. The important contribution made by plasma proteins. *FEBS Letters* 1985, 187(1):33-7.
81. Raffa M, Atig F, Mhalla A, Kerkeni A, Mechri A. Decreased glutathione levels and impaired antioxidant enzyme activities in drug-naive first-episode schizophrenic patients. *BMC Psychiatry* 2011, 11:124.
82. Amminger GP, Schafer MR, Papageorgiou K, Klier CM, Cotton SM, Harrigan SM, et al. Long-chain omega-3 fatty acids for indicated prevention of psychotic disorders: a randomized, placebo-controlled trial. *Archives of General Psychiatry* 2010, 67(2):146-54.
83. Gama CS, Canever L, Panizzutti B, Gubert C, Stertz L, Massuda R, et al. Effects of omega-3 dietary supplement in prevention of positive, negative and cognitive symptoms: a study in

adolescent rats with ketamine-induced model of schizophrenia. *Schizophrenia Research* 2012, 141(2-3):162-7.

84. Dean B. Understanding the role of inflammatory-related pathways in the patho- physiology and treatment of psychiatric disorders: evidence from human peripheral studies and CNS studies. *International Journal of Neuro-Psychopharmacology* 2011;14(7):997e1012.

85. Asevedo E, Gadelha A, Noto C, Mansur RB, Zugman A, Belangero SI, et al. Impact of peripheral levels of chemokines, BDNF and oxidative markers on cognition in individuals with schizophrenia. *Journal of Psychiatric Research* 2013, 47(10):1376-82.

86. Kapczinski F, Dal-Pizzol F, Teixeira AL, Magalhaes PV, Kauer-Sant'Anna M, Klamt F, et al. A systemic toxicity index developed to assess peripheral changes in mood episodes. *Molecular Psychiatry* 2010, 15(8):784-6.

87. Marques AH, Cizza G, Sternberg E. Brain-immune interactions and implications in psychiatric disorders. *Revista Brasileira de Psiquiatria* 2007, 29 Suppl 1:S27-32.

88. Potvin S, Stip E, Sepehry AA, Gendron A, Bah R, Kouassi E. Inflammatory cytokine alterations in schizophrenia: a systematic quantitative review. *Biological Psychiatry* 2008, 63(8):801-8.

89. Monji A, Kato T, Kanba S. Cytokines and schizophrenia: Microglia hypothesis of schizophrenia. *Psychiatry and Clinical Neurosciences* 2009, 63(3):257-65

90. Watanabe Y, Someya T, Nawa H. Cytokine hypothesis of schizophrenia pathogenesis: evidence from human studies and animal models. *Psychiatry and Clinical Neurosciences* 2010, 64(3):217- 30.

91. Domenici E, Wille DR, Tozzi F, Prokopenko I, Miller S, McKeown A, et al. Plasma protein biomarkers for depression and schizophrenia by multi analyte profiling of case-control collections. *Plo S One* 2010, 5(2):e9166.
92. Drexhage RC, Padmos RC, de Wit H, Versnel MA, Hooijkaas H, van der Lely AJ, van Beveren N, deRijk RH, Cohen D. Patients with schizophrenia show raised serum levels of the pro-inflammatory chemokine CCL2: association with the metabolic syndrome in patients? *Schizophrenia Research* 2008;102(1-3):352-5.
93. Na KS, Jung HY, Kim YK. The role of pro-inflammatory cytokines in the neuroinflammation and neurogenesis of schizophrenia. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 2012; Nov 1 [Epub ahead of print].
94. Anderson G, Berk M, Dodd S, Bechter K, Altamura AC, Dell'osso B, et al. Immuno-inflammatory, oxidative and nitrosative stress, and neuroprogressive pathways in the etiology, course and treatment of schizophrenia. *Progress in Neuro- Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 2013, 42:1e4.
95. Sasayama D, Wakabayashi C, Hori H, Teraishi T, Hattori K, Ota M, et al. Association of plasma IL-6 and soluble IL-6 receptor levels with the Asp358Ala polymorphism of the IL-6 receptor gene in schizophrenic patients. *Journal of Psychiatric Research* 2011, 45(11):1439-44.
96. Cazzullo CL, Sacchetti E, Galluzzo A, Panariello A, Colombo F, Zagliani A. Cytokine profiles in drug-naive schizophrenic patients. *Schizophrenia Research* 2001, 47(2-3):293-8.
97. Francesconi LP, Ceresér KM, Mascarenhas R, Stertz L, Gama CS, Belmonte-de- Abreu P. Increased annexin-V and decreased TNF-alpha serum levels in chronic-medicated patients with schizophrenia. *Neuroscience Letters* 2011, 502(3):143-6

98. Mondelli V, Cattaneo A, Murri MB, Di Forti M, Handley R, Hepgul N, et al. Stress and inflammation reduce brain-derived neurotrophic factor expression in first-episode psychosis: a pathway to smaller hippocampal volume. *Journal of Clinical Psychiatry* 2011, 72(12):1677-84.
99. Ransohoff RM. The chemokine system in neuroinflammation: an update. *The Journal of Infectious Disease* 2002, 186(suppl 2):S152–6.
100. Fujii H, Shimada Y, Hasegawa M, Takehara K, Sato S. Serum levels of a Th1 chemoattractant IP-10 and Th2 chemoattractants, TARC and MDC, are elevated in patients with systemic sclerosis. *Journal of Dermatological Science* 2004, 35(1): 43e51.
101. Rostène W, Kitabgi P, Parsadaniantz SM. Chemokines: a new class of neuromodulator? *Nature Reviews Neuroscience* 2007, 8(11):895-903.
102. Barbosa IG, Rocha NP, Bauer ME, de Miranda AS, Huguet RB, Reis HJ, Zunszain PA, Horowitz MA, Pariante CM, Teixeira AL. Chemokines in bipolar disorder: trait or state? *European Archives of Psychiatry Clinical Neuroscience* 2013, 263(2):159-65.
103. Biber K, Zuurman MW, Dijkstra IN, Boddeke HW. Chemokines in the brain: neuroimmunology and beyond. *Current Opinion in Pharmacology* 2002, 2:63–8.
104. Brietzke E, Kauer-Sant’Anna M, Teixeira AL, Kapczinski F. Abnormalities in serum chemokine levels in euthymic patients with bipolar disorder. *Brain, Behavior, and Immunity* 2009;23(8):1079e82.
105. Fernandez-Egea E, Scoriels L, Theegala S, Giro M, Ozanne SE, Burling K, Jones PB. Cannabis use is associated with increased CCL11 plasma levels in young healthy volunteers. *Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry* 2013, 46C:25-28.

106. Charo IF, Ransohoff RM. The many roles of chemokines and chemokines receptors in inflammation. *The New England Journal of Medicine* 2006;354:610–21.
107. Grassi-Oliveira R, Brieztke E, Teixeira A, Pezzi JC, Zanini M, Lopes RP, et al. Peripheral chemokine levels in women with recurrent major depression with suicidal ideation. *Revista Brasileira de Psiquiatria* 2012;34(1):71e5.
108. Reale M, Patruno A, De Lutiis MA, Pesce M, Felaco M, Di Giannantonio M, et al. Dysregulation of chemo-cytokine production in schizophrenic patients versus healthy controls. *BMC Neuroscience* 2011;12:13.
109. Teixeira AL, Reis HJ, Nicolato R, Brito-Melo G, Correa H, Teixeira MM, et al. Increased serum levels of CCL11/eotaxin in schizophrenia. *Progress in NeuroPsychopharmacology & Biological Psychiatry* 2008;32(3):710e4.

#### **4. JUSTIFICATIVA**

Uma vez que a compreensão do papel dos biomarcadores de traço de doença pode abrir novas possibilidades de estadiamento a fim de personalizar e otimizar o tratamento, justifica-se a investigação dos níveis séricos de biomarcadores de estresse oxidativo (TBARS, PCC), de defesa antioxidante (TRAP) e de inflamação (IL-6, IL-10, TNF-alpha, CCL-11/Eotaxin, CCL-24/Eotaxin-2) em pacientes com início recente de doença e com esquizofrenia crônica.

## 5. OBJETIVOS

### Geral

Avaliar a presença de estresse oxidativo e de fatores inflamatórios como possíveis marcadores de estadiamento da esquizofrenia.

### Específicos

Comparar os níveis de marcadores biológicos de estresse oxidativo lipídico (TBARS) e proteico (PCC) e de defesa antioxidante (TRAP) em pacientes com início recente de doença e com esquizofrenia crônica e com controles saudáveis.

Comparar os níveis de marcadores de inflamação (IL-6, IL-10, TNF-alfa, CCL-11/Eotaxin e CCL-24/Eotaxin-2) em pacientes com início recente de doença e com esquizofrenia crônica e com controles saudáveis.

## 6. MÉTODOS

Este projeto incluiu dois grupo de pacientes com esquizofrenia em remissão dos sintomas: um grupo com início recente de doença e um grupo com doença crônica, além de um grupo com controles saudáveis pareados por idade, sexo e escolaridade.

Os pacientes foram recrutados no ambulatório do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Todos os indivíduos tinham pelo menos 18 anos e não mais do que 60 anos. Nenhum deles tinha qualquer doença neurológica, tumor cerebral, doença da tireóide, doença hepática grave, doença cardíaca grave ou qualquer outro diagnóstico psiquiátrico. Pacientes incluídos tinham índice de massa corporal igual ou inferior a 27, eram não-fumantes ou fumando até 10 cigarros por dia. Remissão sintomática foi definida como BPRS (Brief Psychiatry Rating Scale) com pontuação abaixo de 15 (Romano e Elkis, 1996).

Todos os pacientes preencheram critérios para o diagnóstico de esquizofrenia confirmado pela SCID (Entrevista Clínica Estruturada para o DSM- IV) e foram avaliados pela BPRS quanto ao estado psicopatológico.

O grupo controle foi composto por voluntários saudáveis que não tinham história atual ou anterior, bem como sem história familiar de primeiro grau de um transtorno psiquiátrico maior, incluindo demência ou retardo mental. Todos os indivíduos tinham pelo menos 18 anos e não mais de 60 anos, eram não-fumantes ou fumando até 10 cigarros por dia. Nenhum deles tinha qualquer doença clínica grave ou qualquer diagnóstico psiquiátrico avaliado pela SCID.

### Análises Bioquímicas

#### Avaliação dos níveis de dano lipídico

A avaliação da peroxidação lipídica foi realizada no soro dos pacientes, através do método de TBARS, usando o TBARS Assay Kit (Cayman Chemical Company, Ann Arbor) de acordo com as instruções do fabricante. Neste método, a quantificação dos produtos da



peroxidação lipídica é realizada pela formação de substâncias plasmáticas que reagem ao ácido tiobarbitúrico, o que consiste na análise dos produtos finais da peroxidação lipídica (peróxidos lipídicos, malondialdeídos e demais aldeídos de baixo peso molecular) que, ao reagirem com o ácido 2-tiobarbitúrico, formam bases de Schiff. Tais complexos são coloridos e sua concentração pode ser determinada espectrofotometricamente a 535nm. Os resultados são expressos em  $\mu\text{M}$  de MDA.

#### Avaliação da defesa antioxidante

As defesas celulares antioxidantes não-enzimáticas foram estimadas pela TRAP, a qual determina o potencial antioxidante não enzimático, tal como descrito anteriormente (Wayner et al., 1985).

#### Avaliação dos níveis de danos a proteínas

A determinação de proteínas carboniladas foi realizada espectrofotometricamente segundo Levine et al. (1990), no soro dos pacientes, utilizando o reagente 2,4-difenilhidrazina (DNPH) para demonstrar a presença de grupos carbonilas. Os resultados são expressos em nmol de DNPH/mg de proteínas.

#### Avaliação dos marcadores inflamatórios

As citocinas séricas IL-6, IL-10 e TNF-alfa foram medidas de acordo com os procedimentos fornecidos pelo fabricante, utilizando kits sanduíche de ELISA altamente sensível para o TNF-alfa, IL-6 e IL-10 (Quantikine, R & D Systems, Minneapolis, Minnesota, EUA).

As quimiocinas séricas CCL-11 e CCL-24 foram medidas de acordo com os procedimentos fornecidos pelo fabricante, utilizando kits sandwich-ELISA altamente sensíveis para CCL11/Eotaxin humano e CCL24/Eotaxin-2/MPIF-2 humano (Quantikine, R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, EUA).

#### Análise Estatística

Para descrição da amostra foram utilizadas análises descritivas. As médias dos grupos foram comparadas utilizando testes paramétricos ou não paramétricos quando necessário. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

## **7. ASPECTOS ÉTICOS**

Este estudo foi aprovado no comite de ética do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre sob o número 100348.

A participação no estudo ocorreu somente mediante autorização dos participantes, através de um termo de consentimento informado, no qual é garantida plena liberdade para interromper a participação quando o desejar, sem implicar perdas ou prejuízos no atendimento prestado aos pacientes nos serviços.

Neste documento, foram explicados os objetivos, a justificativa e os riscos desta pesquisa. Todas as informações e dados colhidos individualmente foram mantidos em anonimato.

## 8. ARTIGOS

\

# Similarities in serum oxidative stress markers and cytokines in patients with schizophrenia at early and late stage<sup>1</sup>

doi: 10.1016/j.jpsychires.2012.03.019.

Mariana Pedrini, Raffael Massuda, Gabriel R. Fries, Matheus Augusto de Bittencourt Pasquali, Carlos Eduardo Schnorr, José Claudio Fonseca Moreira, Antonio L. Teixeira, Maria Ines Rodrigues Lobato, Julio C. Walz, Paulo Silva Belmonte-de-Abreu, Marcia Kauer-Sant'Anna, Flavio Kapczinski, Clarissa S. Gama

Laboratory of Molecular Psychiatry and INCT for Translational Medicine, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Psiquiatria, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

## ABSTRACT

Unlike bipolar disorder (BD), schizophrenia (SZ) presents a unique and severe deterioration pattern at the very beginning of the disease and the overt syndrome would not indicate staging possibilities. The pathophysiology of SZ could be the result of deregulation of synaptic plasticity, with downstream alterations of neurotrophins, impaired antioxidant defense and increased lipid peroxidation. The aim of this study was to examine several biological markers in early and late phases of the disorder, and to test for evidence of progression in oxidative stress and inflammatory impairment. We examined TBARS, TRAP, PCC, IL-6, IL-10 and TNF- alpha. This double case-control design included 22 patients at early-stage of SZ, 39 patients at late-stage of SZ and their respective matched controls. The present study provided evidence consistent with comparable biological markers across SZ: IL-6 was increased in the early and late stages of SZ and IL-10 was increased in late stages, with an increase trend in early stages. However, TNF-alpha levels were similar in patients with SZ at the early and late-stages compared to controls. The results also show an increased redox status, indicated by higher serum levels of TBARS and PCC in the early and late-stage of SZ, compared to controls. On the other hand, no differences found in TRAP levels at early and late stages compared to controls. The results suggest that SZ is associated with a chronic immune activation and the concept of biochemical staging proposed by others for BD is not seen in this cohort of patients with SZ, at least for cytokines and oxidative stress markers.

---

<sup>1</sup>Artigo publicado no periódico Journal of Psychiatry Research

## INTRODUCTION

It has been accepted that schizophrenia (SZ) originates from abnormalities occurring during the early stages of neural development (Lieberman, 1999). The pathophysiology of SZ could be the result of deregulation of synaptic plasticity, with downstream alterations of neurotrophins, impaired antioxidant defense and increased lipid peroxidation (Gama et al., 2006; 2007; 2008a; 2008b).

Inflammatory immune processes have been strongly implicated in the pathophysiological mechanisms of SZ (Reddy et al., 1996; Sasayama et al., 2011, Kunz et al., 2011; Drexhage et al., 2011; Cazzullo et al., 2001; Miller et al., 2011; Francesconi et al., 2011). Cytokines regulate inflammation and coordinate both innate and adaptive arms of the immune system (Miller et al., 2011), being important mediators of the cross-talk between the central nervous system and the immune system, which might have implications for clinical psychiatry (Kapczinski et al., 2010; 2011). They can exert cellular effects that, if not adequately moderated or counteracted, ultimately lead to toxicities, physiological deregulation, and medical compromise (Kapczinski et al., 2010; 2011).

Examples of cytokines include interleukins (IL) and tumor necrosis factors (TNF). IL-1, IL-6 and TNF-alpha are considered pro-inflammatory, in the sense that they augment the immune response to infection and inflammation by promoting leukocyte recruitment to inflammatory sites and/or by activating inflammatory cells (Potvin et al., 2007). IL-10 is an anti-inflammatory cytokine that contributes to dampen the immune and inflammatory response (Potvin et al., 2007).

Oxidative damage is a mechanism of cellular injury in a number of conditions, including cancer, inflammatory states, and neurodegeneration (Kapczinski et al., 2011). Increased neuronal oxidative stress levels produce deleterious effects on signal transduction, structural plasticity and cellular resilience, mostly by inducing lipid peroxidation in membranes and direct damage in protein and genes (Gama et al., 2007; 2008a; 2008b). Neurons and glia are particularly vulnerable to inflammatory processes and redox status, and are dependent on the maintenance of neurotrophic activity (Kapczinski et al., 2010; 2011; Kunz et al., 2008; 2011). Furthermore, oxidative stress has been identified as a possible element in the neuropathological processes of SZ (Zhang et al., 2011; Riegel et al., 2010; Dietrich- Muszalska et al., 2010; Kunz et al., 2008; Gama et al., 2006; 2008a; 2008b).

Thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) is one of the well-known secondary products of lipid peroxidation and was used as an indicator of oxidative damage for several diseases (Huang et al., 2010). TBARS has been studied in SZ, providing some evidence of increased levels of lipid peroxidation (Gama et al., 2006; 2008a; 2008b). Major molecular mechanisms induced by oxidative stress are protein oxidation. Structural changes by oxidative stress in proteins are characterized by carbonyl formation, so the protein carbonyl content (PCC) indicates oxidative stress (Dietrich-Muszalska et al., 2009a). Total reactive antioxidant potential (TRAP) is one of the methods most employed to estimate the antioxidant capacity of samples in vitro (Dresch et al., 2009).

Staging models for SZ (Agius et al., 2010; Wood et al., 2011) and bipolar disorder (BD) (Vieta et al., 2010; Kapczinski et al., 2009a; 2009b; Berk et al., 2007) have been proposed in order to personalize and optimize treatments (Berk et al., 2009). During the SZ course, patients present deterioration, suggesting that a degenerative process operates during the first years of illness (Liebman, 1999). The staging consisted on prodrome, first episode and chronic phases (Agius

et al., 2010). Unlike BD, SZ present a unique and severe deterioration pattern at the very beginning of the disease. Episode dependant deterioration pattern have been widely described in BD by serum biomarkers (Kauer-Sant'Anna et al., 2008; Berk et al., 2011), brain imaging (Strakowski et al., 2002; Velakoulis et al., 2006) and functioning (Reinares et al., 2010; Scott et al., 2006). The overt BD would be staged in four categories, according to functioning and cognition (Kapczinski et al., 2009b). Whereas in SZ, the overt syndrome would not indicate staging possibilities (Agius et al., 2010).

In order to characterize several biological markers in early and late phases of the disorder, and to test for evidence of progression in oxidative stress and inflammatory impairment, the present study examined TBARS, TRAP, PCC, IL-6, IL- 10 and TNF-alpha. The study included separate control groups for early and late stage of SZ.

We hypothesized that oxidative stress and inflammatory markers would be comparable across the two samples, since the patients already have a cognitive and functional deterioration from the prodromal phase of illness.



## **METHODS**

This study protocol was approved by the Ethical Committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brazil (HCPA). In accordance with the Declaration of Helsinki, all subjects were advised about the procedure and signed the informed consent prior to participation. Sixty-one patients with SZ and fifty-seven healthy controls matched for age, gender and education were recruited. The double case- control design included 22 patients at early-stage of SZ (within first 10 years of a psychotic episode); 39 patients at late-stage of SZ (minimum 10 years after diagnosis of SZ) and their respective matched controls (25 and 32 subjects). All patients had to fulfill the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders; fourth Edition (DSM-IV) for SZ in the Structured Clinical Interview (SCID-I) and their psychopathological state were assessed by the 18-item Brief Psychiatry Rating Scale (BPRS) (Romano and Elkis, 1996). The control group consisted of healthy volunteers who had no current or previous history as well as no first-degree family history of a major psychiatric disorder, including dementia or mental retardation assessed by the non-patient version of the Structured Clinical Interview for DSM-IV (SCID).

Patients were recruited from HCPA through the outpatients' clinic. All subjects were required to be at least age 18 and no older than 60. None of them had any neurological disease, brain tumor, thyroid disease, severe hepatic disease, severe cardiac disease or any other psychiatric diagnosis. Included patients had body mass index at or below 27, they were non-smokers or smoked up to 10 cigarettes per day.

Each subject had 5 ml blood samples collected by venipuncture without anticoagulants, and serum was obtained by centrifugation at 300 x g for 5 min and kept frozen at – 70o C for up to 6 months, until the assay.

The levels of lipid peroxidation were measured using the TBARS method described by Wills (1966), and data were expressed as nmol/mL. The oxidative damage to proteins was measured by the determination of carbonyl groups (protein carbonyl content) based on the reaction with dinitrophenylhydrazine (DNPH), as previously described (Levine et al., 1990). The non-enzymatic antioxidant cellular defenses were estimated by the total radical-trapping antioxidant parameter (TRAP), which determines the non-enzymatic antioxidant potential, as previously described (Wayner et al., 1985). Serum cytokines (IL-6, IL-10 and TNF- $\alpha$ ) were measured according to the procedures supplied by the manufacturer using highly sensitive sandwich-ELISA kits for TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-10 (Quantikine, R&D Systems, Minneapolis, Minn., USA). All samples were assayed in duplicates.

Analysis was performed using Statistical Product and Service Solutions 16.0 Version (SPSS). Demographic and clinical characteristics were analyzed using, Chi-Square, Mann-Whitney or T-test. Descriptive analyses are presented as mean(standard deviation) and p-values < 0.05 were considered significant.

## RESULTS

The subjects' characteristics are summarized in Table 1.

TBARS ( $p < 0.0001$  for early and late-stage groups), IL-6 ( $p < 0.0001$  for early,  $p = 0.003$  for late-stage) and PCC ( $p = 0.001$  for early,  $p = 0.006$  for late-stage) levels were significantly higher in patients with SZ at early and late-stages than in controls. There were no differences for TRAP ( $p = 0.083$  for early,  $p = 0.731$  for late-stage) and TNF-alpha ( $p = 0.786$  for early,  $p = 0.114$  for late-stage) levels in patients with SZ at early and late-stages than in controls. IL-10 levels were decreased in patients at late-stage ( $p = 0.006$ ) and a decrease trend in early stage was found ( $p = 0.053$ ) (Figures 1 and 2).

## DISCUSSION

As far as we are aware, this is the first study to examine oxidative stress markers and cytokines levels at early and late stages of SZ. The results suggest that SZ is associated with a chronic immune activation and the concept of biochemical staging proposed by others for BD (Kapczinski et al., 2009a; Kauer-Sant'Anna et al., 2008; Berk et al., 2007) is not seen in this cohort of patients with SZ, at least for cytokines and oxidative stress markers. For instance, IL-6 was increased in the early and late stages of SZ and IL-10 was decreased in late stages, with a decrease trend in early stages. However, TNF-alpha levels were similar in patients with SZ at the early and late-stages compared to controls. The results also show an increased redox status, indicated by higher serum levels of TBARS and PCC in the early and late-stage of SZ, compared to controls. On the other hand, no differences found in TRAP levels at early and late stages compared to controls.

Increased IL-6 level is one of the most robust findings in the study of inflammatory markers in SZ, as evidenced by a meta-analysis of 19 studies and 1219 patients (Sasayama et al., 2011; Potvin et al., 2007). Consistent with our findings, a recent study with patients with recent-onset SZ found activation of pro-inflammatory networks (Drexhage et al., 2011; Miller et al., 2011).

A recent study presented that patients with first-episode of psychosis had increased levels of IL-6 gene expression when compared with controls, suggesting a pro-inflammatory state to be associated with decreased levels of BDNF and smaller hippocampal volume (Mondelli et al., 2011). In accordance with our findings, a recent meta-analysis has reported that blood IL-10 levels were significantly decreased and IL-6 levels were significantly increased in acutely relapsed patients compared to control subjects (Miller et al., 2011). As reported by previous studies (Kunz et al., 2011; Francesconi et al., 2011) the fact that TNF-alpha levels were not

different from those of the controls in our sample could be explained by the non-acute profile of the patients. In SZ, however, defining remission in a chronically ill and stable population may not allow for a clear differentiation of state and trait effects (Kunz et al., 2011).

In line with our findings, a recent meta-analysis showed that TBARS are significantly increased in SZ (Zhang et al., 2010). Previous studies have found increased levels of serum TBARS predominantly in never-medicated schizophrenia patients compared to controls (Arvindakshan et al., 2003). Increased oxidative stress has been suggested in the pathophysiology of SZ, based on the increased peroxidation at the onset of psychosis in never-medicated patients (Arvindakshan et al., 2003). Gama et al., found elevated TBARS levels in chronically medicated SZ patients compared to controls, suggesting that the high level of TBARS is a sign of peroxidative injury to membrane phospholipids (Gama et al., 2006).

In our study, we presented elevated PCC levels in the early and late-stage of SZ, compared to controls. Corroborating our findings, Dietrich-Muszalska et al. found, in platelet proteins from patients with SZ, a statistically significant increase of the level of biomarkers of oxidative/nitrative stress such as carbonyl groups (Dietrich- Muszalska et al., 2009b). Furthermore, we found total antioxidant defense, presented by TRAP levels, similar in both stages and controls. It seems that patients do not perform an antioxidant action reactive to the illness injury. In line with our findings, earlier results showed significantly increased TBARS levels in patients with SZ, whereas the activities of antioxidant defense enzymes were not increased (Dietrich- Muszalska et al., 2010).

Our findings support the growing body of evidence corroborating the early central nervous system damage hypothesis in SZ, suggesting a different pattern of damage between SZ and BD, with an early degenerative component preceding the illness onset in SZ (Velakoulis et al.,

2006) and an episode-dependent pattern of deterioration in BD (Strakowski et al., 2002). As reported by Kunz et al., this observation brings us back to the classic differentiation between SZ and BD, based on either an episodic or a chronic-deteriorating course (Kunz et al., 2011). In the same venue, while increased IL-6, IL-10, TBARS and PCC seem to be a state effect in BD, it seems to be a trait effect in SZ (Kunz et al., 2011).

Our report must be interpreted in light of its limitations. The study was not longitudinal; it did not allow us a direct examination of the course of oxidative stress markers and cytokines in SZ. Nevertheless, the inclusion of two control groups matched to early and late stage groups allowed differentiation of age, sex and diagnosis effects.

The present study provided evidence consistent with comparable biological markers across SZ. It is conceivable that increased cytokines levels and impaired anti-oxidative stress defense may synergistically function in favor of neuronal degeneration in SZ. Overall, these clinical observations are consistent with differences reported in brain structure, metabolic and biochemical changes observed (Velakoulis et al., 2006; Gama et al., 2006; 2007; 2008a; 2008b). As corroborated by Sponheim et al., cognitive deficits could be comparable from early in the course of SZ to the chronic phase of the disorder, without progressing beyond what is expected with normal aging (Sponheim et al., 2010).

In conclusion, our findings provide important information about biological markers in early and late stages of SZ, a data that would be important to consider in interpreting findings of anomalous brain structure and function, reinforcing the need of assessment of individuals in ultra high risk to develop psychosis. Prospective studies are needed to confirm these findings. Future studies of cytokines and oxidative stress markers in SZ and in at-risk/first episode

populations, together with neuroimaging techniques, should stratify patients by clinical status to better guide interventions.

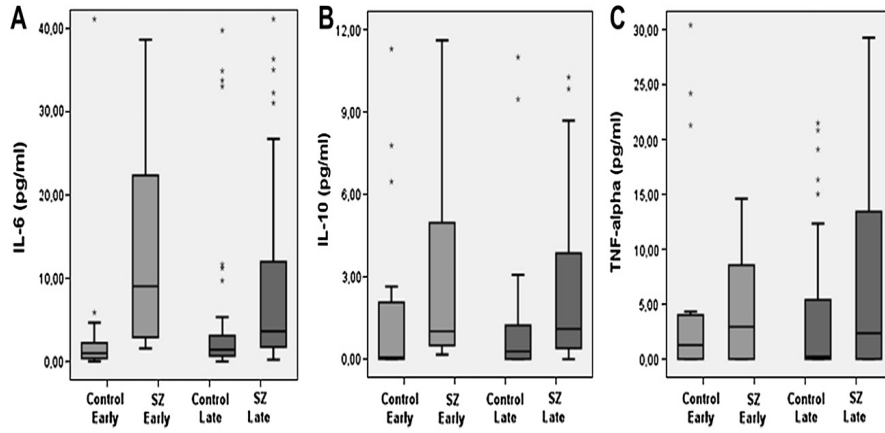
**Table 1**

Characteristics of healthy controls and patients with schizophrenia (SZ).

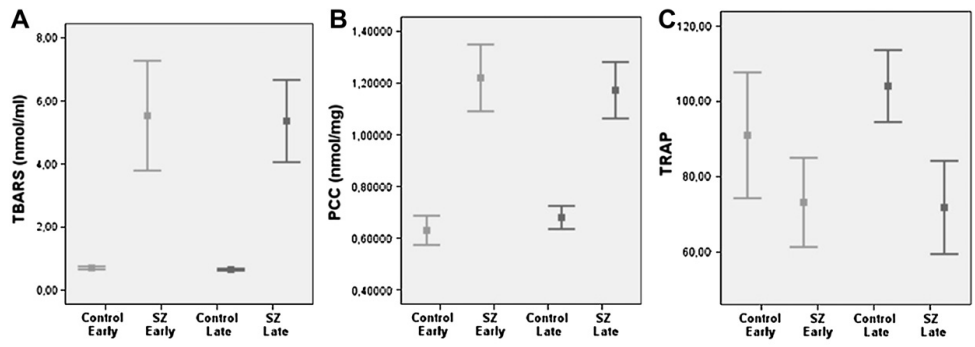
	Early stage			Late stage		
	SZ (n = 22)	Controls (n = 25)	p-Value	SZ (n = 39)	Controls (n = 32)	p-Value
Gender (Male/female)	14/8	14/11	0.408 <sup>c</sup>	28/11	18/14	0.133 <sup>c</sup>
Age (years) <sup>a</sup>	25.85 (4.38)	26.16 (4.40)	0.791 <sup>d</sup>	45.14 (5.68)	46.22 (10.18)	0.583 <sup>d</sup>
Years of illness (number of years after first episode) <sup>a</sup>	7.25 (5.34)	–	–	21.19 (9.20)	–	–
BPRS score <sup>a</sup>	11.82 (12.72)	–	–	15.09 (7.82)	–	–
TBARS <sup>a</sup>	5.53 (3.92)	0.71 (0.11)	<0.0001 <sup>d</sup>	5.36 (4.02)	0.66 (0.12)	<0.0001 <sup>d</sup>
PCC <sup>a</sup>	1.22 (0.29)	0.63 (0.14)	0.001 <sup>d</sup>	1.72 (0.34)	0.69 (0.18)	0.006 <sup>d</sup>
TRAP <sup>a</sup>	73.20 (26.72)	91.02 (40.47)	0.083 <sup>d</sup>	71.84 (13.03)	1.42 (2.45)	0.731 <sup>d</sup>
IL-6 <sup>b</sup>	9.03 (2.76–26.10)	1.00 (0.33–2.76)	<0.0001 <sup>e</sup>	3.62 (1.72–14.75)	1.42 (0.67–3.12)	0.003 <sup>e</sup>
IL-10 <sup>b</sup>	1.01 (0.43–5.30)	0.56 (0–2.29)	0.053 <sup>e</sup>	1.10 (0.34–3.87)	0.28 (0–1.30)	0.006 <sup>e</sup>
TNF-alpha <sup>b</sup>	2.93 (0–9.92)	1.27 (0–4.05)	0.786 <sup>e</sup>	2.35 (0–15.28)	0.22 (0–5.85)	0.114 <sup>e</sup>
Antipsychotic daily dose, in mg of chlorpromazine equivalents <sup>d</sup>	409.06 (146.87)	–	–	540.58 (232.53)	–	–

<sup>a</sup> Mean (SD).<sup>b</sup> Median (interquartile range).<sup>c</sup> Chi-square.<sup>d</sup> T-test.<sup>e</sup> Mann–Whitney.





**Fig. 1.** A) Box-plot of serum IL-6 levels in patients with SZ at early and late stages and their matched controls. Median levels are indicated by horizontal lines. Mann–Whitney test was performed to compare groups (control vs. SZ early,  $p < 0.0001$ ; control vs. SZ late,  $p = 0.003$ ). B) Box-plot of serum IL-10 levels in patients with SZ at early and late stages and their matched controls. Median levels are indicated by horizontal lines. Mann–Whitney test was performed to compare groups (control vs. SZ early,  $p = 0.053$ ; control vs. SZ late,  $p = 0.006$ ). C) Box-plot of serum TNF-alpha levels in patients with SZ at early and late stages and their matched controls. Median levels are indicated by horizontal lines. Mann–Whitney test was performed to compare groups (control vs. SZ early,  $p = 0.786$ ; control vs. SZ late,  $p = 0.114$ ).



**Fig. 2.** A) Error bar of serum TBARS levels in patients with SZ at early and late stages and their matched controls. Mean levels are indicated by squares. T-test was performed to compare groups (control vs. SZ early,  $p < 0.0001$ ; control vs. SZ late,  $p < 0.0001$ ). B) Error bar of serum PCC levels in patients with SZ at early and late stages and their matched controls. Mean levels are indicated by squares. T-test was performed to compare groups (control vs. SZ early,  $p = 0.001$ ; control vs. SZ late,  $p = 0.001$ ). C) Error bar of serum TRAP levels in patients with SZ at early and late stages and their matched controls. Mean levels are indicated by squares. T-test was performed to compare groups (control vs. SZ early,  $p = 0.083$ ; control vs. SZ late,  $p < 0.731$ ).

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

Clarissa Severino Gama has received research grants from CNPq (Universal 477974/2009-0 and PQ 305967/2008-8), FAPERGS (PqG 1009340 - 06/2010) and FAPERGS/CNPq (PRONEM 11/2057-2), Brazil.

## REFERENCES

Agius M, Goh C, Ulhaq S, McGorry P. The staging model in schizophrenia, and its clinical implications. *Psychiatria Danubia* 2010;22(2):211-20.

Arvindakshan M, Sitasawad S, Debsikdar V, Ghate M, Evans D, Horrobin DF, et al.. Essential polyunsaturated fatty acid and lipid peroxide levels in never-medicated and medicated schizophrenia patients. *Biological Psychiatry* 2003;53(1):56-64.

APA. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. Washington, DC: American Psychiatric Association; 2000.

Berk M, Hallam KT, McGorry PD. The potential utility of a staging model as a course specifier: a bipolar disorder perspective. *Journal of Affective Disorders* 2007; 100(3):279-81.

Berk M, Malhi GS, Hallam K, Gama CS, Dodd S, Andreazza AC, et al. Early intervention in bipolar disorders: clinical, biochemical and neuroimaging imperatives. *Journal of Affective Disorders* 2009;114(1-3):1-13.

Berk M, Kapczinski F, Andreazza AC, Dean OM, Giorlando F, Maes M, et al. Pathways underlying neuroprogression in bipolar disorder: focus on inflammation, oxidative stress and neurotrophic factors. *Neuroscience Biobehavior Review* 2011;35(3):804-17.

Cazzullo CL, Sacchetti E, Galluzzo A, Panariello A, Colombo F, Zagliani A. Cytokine profiles in drug-naive schizophrenic patients. *Schizophrenia Research* 2001;47(2-3):293-8.

Drexhage RC, Hoogenboezem TA, Cohen D, Versnel MA, Nolen WA, van Beveren NJ, et al. An activated set point of T-cell and monocyte inflammatory networks in recent-onset schizophrenia patients involves both pro- and anti-inflammatory forces. *International Journal of Neuropsychopharmacology* 2011;14(6):746-55.

Dietrich-Muszalska A, Olas B, Głowacki R, Bald E. Oxidative/nitrative modifications of plasma proteins and thiols from patients with schizophrenia. *Neuropsychobiology* 2009a;59(1):1-7.

Dietrich-Muszalska A, Olas B. Modifications of blood platelet proteins of patients with schizophrenia. *Platelets* 2009b;20(2):90-6.

Dietrich-Muszalska A, Kontek B. Lipid peroxidation in patients with schizophrenia. *Psychiatry and Clinical Neurosciences* 2010;64(5):469-75.

Dresch MT, Rossato SB, Kappel VD, Biegelmeyer R, Hoff ML, Mayorga P, et al. Optimization and validation of an alternative method to evaluate total reactive antioxidant potential. *Analytical Biochemistry* 2009; 385(1):107-14.

Francesconi LP, Ceresér KM, Mascarenhas R, Stertz L, Gama CS, Belmonte-de- Abreu P. Increased annexin-V and decreased TNF-alpha serum levels in chronic-medicated patients with schizophrenia. *Neuroscience Letters* 2011;502(3):143-6

Gama CS, Salvador M, Andreazza AC, Kapczinski F, Belmonte-de-Abreu PS. Elevated serum superoxide dismutase and thiobarbituric acid reactive substances in schizophrenia: a study of patients treated with haloperidol or clozapine. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 2006; 30 (3): 512-5.

Gama CS, Andreazza AC, Kunz M, Berk M, Belmonte-de-Abreu PS, Kapczinski F. Serum levels of brain-derived neurotrophic factor in patients with schizophrenia and bipolar disorder. *Neuroscience Letters* 2007; 420(1):45-8.

Gama CS, Berk M, Andreazza AC, Kapczinski F, Belmonte-de-Abreu P. Serum levels of brain-derived neurotrophic factor and thiobarbituric acid reactive substances in chronically medicated schizophrenic patients: a positive correlation. *Revista Brasileira de Psiquiatria* 2008a; 30(4):337-40.

Gama CS, Salvador M, Andreazza AC, Lobato MI, Berk M, Kapczinski F, Belmonte- de-Abreu PS. Elevated serum thiobarbituric acid reative substances in clinically symptomatic schizophrenic males. *Neuroscience Letters* 2008b; 433 (3): 270-3.

Huang TL, Liou CW, Lin TK. Serum thiobarbituric acid-reactive substances and free thiol levels in schizophrenia patients: effects of antipsychotic drugs. *Psychiatry Research* 2010;177(1-2):18-21.

Kapczinski F, Dias VV, Kauer-Sant'Anna M, Brietzke E, Vázquez GH, Vieta E, et al The potential use of biomarkers as an adjunctive tool for staging bipolar disorder. *Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry* 2009a;33(8):1366-71.

Kapczinski F, Dias VV, Kauer-Sant'Anna M, Frey BN, Grassi-Oliveira R, Colom F, et al. Clinical implications of a staging model for bipolar disorders. *Expert Review of Neurotherapeutics* 2009b;9(7):957-66.

Kapczinski F, Dal-Pizzol F, Teixeira AL, Magalhaes PV, Kauer-Sant'Anna M, Klamt F, et al. A systemic toxicity index developed to assess peripheral changes in mood episodes. *Molecular Psychiatry* 2010;15(8):784-6.

Kapczinski F, Dal-Pizzol F, Teixeira AL, Magalhaes PV, Kauer-Sant'Anna M, Klamt F, Moreira JC, de Bittencourt Pasquali MA, Fries GR, Quevedo J, Gama CS, Post R. Peripheral biomarkers and illness activity in bipolar disorder. *Journal of Psychiatric Research* 2011; 45(2):156-61.

Kauer-Sant'Anna M, Kapczinski F, Andreazza AC, Bond DJ, Lam RW, Young LT, Yatham LN. Brain-derived neurotrophic factor and inflammatory markers in patients with early- vs. late-stage bipolar disorder. *International Journal of Neuropsychopharmacology* 2008;12(4):447-58.

Kunz M, Gama CS, Andreazza AC, Salvador M, Ceresér KM, Gomes FA, et al. Elevated serum superoxide dismutase and thiobarbituric acid reactive substances in different phases of bipolar disorder and in schizophrenia. *Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry* 2008; 32(7):1677-81,

Kunz M, Ceresér KM, Goi PD, Fries GR, Teixeira AL, Fernandes BS, et al. Serum levels of IL-6, IL-10 and TNF- $\alpha$  in patients with bipolar disorder and schizophrenia: differences in pro- and anti-inflammatory balance. *Revista Brasileira de Psiquiatria* 2011;33(3):268-74.

Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology* 1990;186:464-78.

Lieberman JA. Pathophysiologic mechanisms in the pathogenesis and clinical course of schizophrenia. *Journal of Clinical Psychiatry* 1999;60 Suppl 12:9-12.

Miller BJ, Buckley P, Seabolt W, Mellor A, Kirkpatrick B. Meta-Analysis of Cytokine Alterations in Schizophrenia: Clinical Status and Antipsychotic Effects. *Biological Psychiatry* 2011;70(7):663-71.

Mondelli V, Cattaneo A, Murri MB, Di Forti M, Handley R, Hepgul N, et al. Stress and inflammation reduce brain-derived neurotrophic factor expression in first-episode psychosis: a pathway to smaller hippocampal volume. *Journal of Clinical Psychiatry* 2011 May 18 In Press.

Potvin S, Stip E, Sepehry AA, Gendron A, Bah R, Kouassi E. Inflammatory cytokine alterations in schizophrenia: a systematic quantitative review. *Biological Psychiatry* 2008;63(8):801-8.

Reddy RD, Yao JK. Free radical pathology in schizophrenia: a review. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 1996; 45:43-49.

Reinares M, Colom F, Rosa AR, Bonnín CM, Franco C, Solé B, et al. The impact of staging bipolar disorder on treatment outcome of family psychoeducation. *Journal of Affective Disorders* 2010;123(1-3):81-6.

Riegel RE, Valvassori SS, Moretti M, Ferreira CL, Steckert AV, de Souza B, et al. Intracerebroventricular ouabain administration induces oxidative stress in the rat brain *International Journal of Developmental Neuroscience*. 2010;28(3):233-7.

Romano F, Elkis H. Tradução e Adaptação de um Instrumento de Avaliação Psicopatológica das Psicoses: Escala Breve de Avaliação Psiquiátrica. Versão Ancorada (BPRS-A), *Jornal Brasileiro de Psiquiatria* 1996; 45: 43-49.

Sasayama D, Wakabayashi C, Hori H, Teraishi T, Hattori K, Ota M, et al. Association of plasma IL-6 and soluble IL-6 receptor levels with the Asp358Ala polymorphism of the IL-6 receptor gene in schizophrenic patients. *Journal of Psychiatric Research* 2011;45(11):1439-44.

Scott J, Paykel E, Morriss R, Bentall R, Kinderman P, Johnson T, et al. Cognitive- behavioural therapy for severe and recurrent bipolar disorders: randomised controlled trial. *British Journal of Psychiatry* 2006;188:313-20.

Sponheim SR, Jung RE, Seidman LJ, Mesholam-Gately RI, Manoach DS, O'Leary DS, et al. Cognitive deficits in recent-onset and chronic schizophrenia. *Journal of Psychiatric Research* 2010;44(7):421-8.

Strakowski SM, DelBello MP, Zimmerman ME, Getz GE, Mills NP, Ret J, et al. Ventricular and periventricular structural volumes in first- versus multiple- episode bipolar disorder. *American Journal of Psychiatry* 2002;159(11):1841-7.

Velakoulis D, Wood SJ, Wong MT, McGorry PD, Yung A, Phillips L, et al. Hippocampal and amygdala volumes according to psychosis stage and diagnosis: a magnetic resonance imaging

study of chronic schizophrenia, first- episode psychosis, and ultra-high-risk individuals. Archives of General Psychiatry 2006;63(2):139-49.

Vieta E, Reinares M, Rosa AR. Staging bipolar disorder. Neurotoxicity Research 2011; 19(2):279-85.

Zhang M, Zhao Z, He L, Wan C. A meta-analysis of oxidative stress markers in schizophrenia. Science China Life Sciences 2010;53(1):112-24.

Wayner DD, Burton GW, Ingold KU, Locke S. Quantitative measurement of the total, peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation. The important contribution made by plasma proteins. FEBS Letters 1985;187(1):33-7.

Wills ED. Mechanisms of lipid peroxide formation in animal tissues. Biochemical Journal 1966; 99:667-76.

Wood SJ, Yung AR, McGorry PD, Pantelis C. Neuroimaging and treatment evidence for clinical staging in psychotic disorders: from the at-risk mental state to chronic schizophrenia. Biological Psychiatry 2011;70(7):619-25.

## Differences in eotaxin serum levels in patients with recent onset and chronic stable schizophrenia: a clue for understanding aging profile<sup>2</sup>

Mariana Pedrini, Raffael Massuda, David de Lucena, Danielle Macêdo, André Vinícius Contri Paz, Maria Ines R. Lobato, Paulo S. Belmonte-de-Abreu, Keila M. Cereséras, Natalia Pessoa Rocha, Mariana D. Curra, Bruna S. Panizzutti, Antonio L. Teixeira, Clarissa S. Gama

Laboratory of Molecular Psychiatry and INCT for Translational Medicine, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Psiquiatria, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

Increased serum concentration of several pro-inflammatory cytokines has been most clearly implicated in the etiology and pathology of SZ. A promising strategy to investigate inflammation in SZ is to focus on a special type of cytokines involved in attraction of cells to the inflammation site, such as the chemokines. Chemokines seem to play a crucial role in neurodegeneration because most neurodegenerative diseases known are accompanied by increases in their expression. The aim of this study was to investigate serum levels of two chemokines: CCL-11 (Eotaxin) and CCL-24 (Eotaxin-2), in recent onset (RO) and chronic patients (CP) with SZ in symptomatic remission. Seventy-nine subjects were recruited. Twenty-three RO patients (within first 5 years of SZ diagnosis), nineteen CP (minimum of 20 years after the diagnosis of SZ) and their respective matched controls (19 and 18 subjects) were included. Each subject had 5 ml blood samples collected by venipuncture to examine CCL-11 and CCL-24. CCL-24 serum levels were significantly higher in RO ( $p=0.010$ ) and CP ( $p=0.034$ ) with SZ compared to controls. CCL-11 serum levels were similar in RO ( $p=0.806$ ) and increased in CP ( $p=0.001$ ) compared to controls. Our findings reinforce that SZ is associated with an inflammatory profile, suggesting that CCL-11 might be a peripheral biomarker for aging in SZ that could be useful as a staging trait biomarker for the disease.

---

<sup>2</sup>Artigo submetido ao periódico Schizophrenia Research



## INTRODUCTION

The pathophysiology of schizophrenia (SZ) could be the result of deregulation of synaptic plasticity, alterations of neurotrophins, impaired antioxidant defense, increased peroxidation and hyper-regulated inflammatory immune processes, present in the early and late phases of the disorder (Ng et al., 2008, Gama et al., 2006, 2007, 2008a,b, 2012, Pedrini et al., 2012). Increased serum concentration of several pro-inflammatory cytokines has been most clearly implicated in the etiology and pathology of SZ (Monji et al., 2009; Watanabe et al., 2010; Domenici et al., 2010; Na et al., 2012; Pedrini et al., 2012; Anderson et al., 2013).

Among inflammatory mediators, SZ has been consistently associated with abnormalities in cytokines which are proteins involved in the coordination of immune responses and exertion of neuromodulatory actions (Asevedo et al., 2013). Thus, a promising strategy to investigate the role of inflammation in SZ is to focus on a special type of cytokines involved in the attraction of cells to the inflammatory site, such as the chemokines CXCL-10/IP-10, CXCL-8/IL-8, CCL-11, CCL-24/Eotaxin-2, CCL-2/MCP-1, CCL-3/MIP-1 (Asevedo et al., 2013). Chemokines, or chemotactic cytokines, are small proteins, classically defined by their ability to direct the movement of circulating leukocytes to sites of inflammation or injury (Ransohoff, 2002; Fuji et al., 2003; Rostène et al., 2007; Barbosa et al., 2013). They have been implicated not only in leukocyte recruitment, but also in apoptosis, angiogenesis, and neurogenesis (Barbosa et al., 2013). Evidence points towards an interaction between chemokine and neurotransmitter systems in the brain, playing crucial roles in brain development and function (Drexhage et al., 2008; Adler & Roger, 2005). Approximately 50 different human chemokines have been described which interact with 18 different chemokine receptors (Biber et al., 2002). The binding of a chemokine to its receptor activates a signaling cascade that results in increased calcium

concentrations and activation of mitogen-activated protein kinases, a mechanism important for synaptic plasticity (Rostène et al., 2007, Brietzke et al., 2009).

The evidence that most neurodegenerative diseases are accompanied by increased chemokine expression (Biber et al., 2002; Charo & Ransohoff, 2006) reinforces their crucial role in neurodegeneration. Beyond that, chemokines have been suggested as potentially useful biomarkers in psychiatric disorders commonly associated to accelerated aging (Grassi Oliveira et al., 2012; Asevedo et al., 2013). Nevertheless, only a few studies have evaluated the role of chemokines and its receptors in the neurobiology of SZ. These studies found increased levels of CCL-2/MCP-1, CCL-3/ MIP-1, CXCL-8/IL-8, IL-18, RANTES and CCL-22 in this condition (Domenici et al., 2010; Reale et al., 2011).

Observations of immune deregulation in SZ overlap with central pathophysiological mechanisms as well as with clinical manifestations of the illness (Kunz et al., 2011). Many findings, such as excessive cardiovascular mortality and shorter natural lifespan in SZ compared to the general population, share a low grade and persistent activation of inflammatory mechanisms that underlie and contribute to the pathophysiology of arteriosclerosis and vascular disorders (Mansur et al., 2012). In the same venue, there is increasing evidence that pathological aging may be a component of SZ, since in this mental disorder there are structural brain abnormalities and brain hypometabolic patterns that mimic findings seen in the elderly (Porton et al., 2008).

The allostatic load model and the neurobiological progression of SZ have supported the idea that individuals with the disorder might progress from the prodromal stage and the first episode to a chronic and disabling stage (Mansur et al., 2012). Nevertheless, SZ presents a unique and severe clinical deterioration pattern at the very beginning of the disease (Lieberman, 1999).

Similarities in several inflammatory and oxidative stress markers have been shown in early and late stages of the disorder (Pedrini et al., 2012). Besides, the natural history of SZ usually involves a prodromal period i.e., when mild symptoms progressively increase in severity, duration and frequency, first episode and chronic phases (Agius et al., 2010).

Since understanding the role of trait disease biomarkers in SZ could potentially open new staging possibilities in order to personalize, optimize and improve treatments, the aim of this study was to investigate serum levels of two chemokines: CCL-11 (Eotaxin) and CCL-24 (Eotaxin-2), in recent onset (RO) and chronic patients (CP) with SZ in symptomatic remission.

## **METHODS**

This study protocol was approved by the Institutional Review Board of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brazil. In accordance with the Declaration of Helsinki, all subjects were advised about the procedure and provided written informed consent prior to enrollment. Forty-two outpatients with SZ and fifty-four healthy controls matched for age, gender and level of education were recruited. The double case-control design included 23 RO patients (within first 5 years of SZ diagnosis), 19 CP (minimum of 20 years after the diagnosis of SZ) and their respective matched controls (19 and 18 subjects). All patients had to fulfill DSM-IV criteria for SZ and their psychopathological state were assessed by the 18-item Brief Psychiatry Rating Scale (BPRS) (Romano & Elkis, 1996). Symptomatic remission was defined as BPRS scores below 15. The control group consisted of healthy volunteers who had no current or previous history as well as no first-degree family history of a major psychiatric disorder, including dementia or mental retardation.

All subjects were required to be at least age 18 and no older than 60, they were non-smokers or smoked up to 10 cigarettes per day. None of them had any severe clinical diseases or any other psychiatric diagnosis.

Each subject had 5 ml blood samples collected by venipuncture without anticoagulants, and serum was obtained by centrifugation at 2000g for 5min and kept frozen at -70°C for up to 6 months, until the assay.

Serum chemokines (CCL-11 and CCL-24) were measured according to the procedures supplied by the manufacturer using highly sensitive sandwich-ELISA kits for human CCL-11/Eotaxin and human CCL-24/Eotaxin-2/MPIF-2 (Quantikine, R&D Systems, Minneapolis, Minn., USA). All

samples were assayed in duplicates.

Analysis was performed using SPSS Version 20.0. Demographic and clinical characteristics were analyzed using Chi-Square, Mann-Whitney or T-test when appropriate. Descriptive analyses are presented as mean and standard deviation or median and interquartile range. P-values < 0.05 were considered significant.

## RESULTS

The subjects' characteristics are summarized in Table 1.

CCL-24 serum levels were significantly higher in RO ( $p=0.010$ ) and CP ( $p=0.034$ ) with SZ compared to controls. CCL-11 serum levels were similar in RO ( $p=0.806$ ) and increased in CP ( $p=0.001$ ) compared to controls (figure 1).

## DISCUSSION

To our knowledge, this is the first study to examine serum chemokines levels in a sample of two groups of patients with SZ, differing in illness duration: 2.52 (1.83) years for RO and 25.63 (4.66) years for CP.

This study shows that CCL-11 and CCL-24 serum levels were increased in CP when compared to controls. Regarding RO patients, CCL-24 levels were also increased, but CCL-11 levels were not different from controls. In line with our findings, Asevedo et al. (Asevedo et al., 2013) and Teixeira et al. (Teixeira et al., 2008) found increases of CCL-11 in SZ patients. However, the same authors have not shown that differences for CCL-24 serum levels in individuals with SZ. It is important to highlight that our study is the first to show increased CCL-11 levels in CP and not in RO patients with SZ; and similarly increased CCL-24 levels either in RO or CP.

Such findings help to demonstrate that the production of the selected chemokines are deregulated in this brain disorder, and reinforce the theory of peripheral cyto-chemokine networks involvement in the complex pathophysiology of SZ (Drexhage et al., 2008; Reale et al., 2011).

The reason why CCL-11 was elevated only in serum CP with SZ and not in RO patients is not clear, but suggests that there is a differential regulation of the expression of CCR-3-acting chemokines in SZ (Teixeira et al., 2008). Similarly to CCL-24, CCL-11, acts on the chemokine receptor CCR-3, expressed preferentially on eosinophils, mast cells and Th2 lymphocytes (Barbosa et al., 2013). Higher serum levels of CCL-11 and CCL-24 in patients with SZ are consistent with the idea that a preferential activation of Th2 lymphocytes plays a role in the pathogenesis of the disorder (Teixeira et al., 2008). These also corroborate the view that this

disease may be associated with a Th1/Th2 imbalance with a shift toward a Th2 immune response (Potvin et al., 2008; Asevedo et al., 2013; Muller et al., 2011). A shift towards a Th2 immune response would imply the preferential expression of chemokines that attract lymphocytes capable of producing the so called Th2 cytokines, including IL-4, IL-5 and IL-13 (Teixeira et al., 2008).

In a recent preclinical study the infusion of plasma from old mice to young ones led to increased plasma levels of CCL-11 in the young mice. Thus, this study reached the conclusion that this chemokine could be associated with cognitive decline with aging (Villeda et al., 2011; Asevedo et al., 2013). In addition it has been showed increased CCL-11 serum levels in individuals with SZ inversely correlated to performance in working memory test (Asevedo et al., 2013). It has also been established that CCL-11 increases with age in both humans and rodents. Therefore, the serum levels of CCL-11 might serve as a peripheral biomarker for neurogenesis (Fernandez-Egea et al., 2013).

Previous findings suggest a similar pattern of chronic inflammatory activation between RO and chronic stage patients (Pedrini et al., 2012; Miller et al., 2011), supporting the finding of severe clinical deterioration at the very beginning of the disease. Chronic systemic inflammation in SZ may explain the increase in metabolic abnormalities, such as diabetes mellitus, high blood pressure, obesity and dyslipidemia (Mansur et al., 2012). All of these conditions underlie and contribute to the pathophysiology of arteriosclerosis, vascular disorders, accelerating phenotype ageing and shortening lifespan in about 20 years (Thakore, 2004; Kunz et al., 2011). Accelerated telomere shortening and decreased telomerase activity has also been described in SZ (Kao et al., 2008; Porton et al., 2008; Yu, 2008). The presence of significant telomere loss in SZ implies an abnormal aging component in this disorder and may be a trait marker caused by



oxidative stress and DNA instability, mechanisms that have been implicated in SZ pathology (Kao et al., 2008; Porton et al., 2008).

The present study is an innovative one, since it has identified a different pattern of CCL-11 serum levels in RO and CP with SZ. In line with the similarities in CCL-24 serum levels presented by both group of patients when compared to controls, our group previously have not found differences in inflammatory and oxidative stress biomarkers levels in early and late stages of SZ, suggesting an early degenerative component preceding the illness onset in SZ and a chronic pattern of deterioration (Pedrini et al., 2012). In the present study, our approach is that CCL-11 might be a biomarker for aging in SZ. For this reason, increases in CCL-11 levels were found only in CP group. Our findings reinforce that SZ is associated with an inflammatory profile, suggesting that CCL-11 might be a peripheral biomarker for aging in SZ that could be useful as a staging trait biomarker for the disease (Fernandez-Egea et al., 2013; Noto et al., 2013).

Therefore, the results support the growing body of evidence corroborating a potential link between SZ and increased CCL-11 plasma levels as an aging phenotype (Fernandez-Egea et al., 2013). As reported by Fernandez, an interesting, but yet speculative approach is considering CCL-11 as a factor linked to brain aging (Villeda et al., 2011; Fernandez-Egea et al., 2013). Recent studies showed that brain aging has been linked to the use of illegal drugs and with mental disorders, such as bipolar disorder, major depression and SZ (Simon et al., 2006; Yatham et al., 2009; Kirkpatrick et al., 2008; Teixeira et al., 2008; Fernandez-Egea et al., 2013)

Our findings must be interpreted in light of its limitations. The study design was cross-sectional; it did not allow us a direct examination of the course of chemokines in SZ. Nevertheless, the inclusion of two control groups matched to early and late stage groups allowed differentiation of

age, sex and diagnosis effects. The effect of medication on serum biomarkers could not be excluded, however it has been reported that antipsychotics would decrease central and peripheral inflammation (Dean, 2011; Pedrini et al., 2012). Moreover, it is uncertain whether antipsychotics may have an effect on the serum levels of CCL-11 (Fernandez-Egea et al., 2013).

In conclusion, this study provides important information about biological markers in different stages of SZ, supporting the hypothesis that SZ is associated with a pro-inflammatory activation. This study importantly suggests that higher levels of serum peripheral CCL-11 is increased in patients with more than 20 years of disease, at least in this cohort; and might be a trait biomarker for accelerated aging process that occurs in SZ. This is probably related to a greater inflammatory activation, impaired functionality, increased mortality, and to other clinical diseases that overlap in patients with SZ. Additional studies relating telomere shortening with CCL-11 would be helpful in giving a sharper answer about the CCL-11's role in SZ as a possible trait biomarker. Discovering this chemokine's role and adopting a clinical staging model approach is particularly useful and may help to prevent the pathological aging consequences and optimize treatments for this condition.

## REFERENCES

- Adler, M.W., Rogers, T.J., 2005. Are chemokines the third major system in the brain? *Journal of Leukocyte Biology* 78:1204–9.
- Agius, M., Goh, C., Ulhaq, S., McGorry, P., 2010. The staging model in schizophrenia, and its clinical implications. *Psychiatria Danubina* 22(2):211e20.
- Anderson, G., Berk, M., Dodd, S., Bechter, K., Altamura, A.C., Dell'osso, B., Kanba, S., Monji A., Fatemi, S.H., Buckley, P., Debnath, M., Das, U.N., Meyer, U., Müller, N., Kanchanatawan, B., Maes, M., 2013. Immuno-inflammatory, oxidative and nitrosative stress, and neuroprogressive pathways in the etiology, course and treatment of schizophrenia. *Progress in Neuro- Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 42:1e4.
- Asevedo, E., Gadelha, A., Noto, C., Mansur, R.B., Zugman, A., Belangero, S.I., Berberian, A.A., Scarpato, B.S., Leclerc, E., Teixeira, A.L., Gama, C.S., Bressan, R.A., Brietzke, E., 2013. Impact of peripheral levels of chemokines, BDNF and oxidative markers on cognition in individuals with schizophrenia. *Journal of Psychiatric Research* 47(10):1376-82.
- Barbosa, I.G, Rocha, N.P., Bauer, M.E., de Miranda, A.S., Huguet, R.B., Reis, H.J., Zunszain, P.A., Horowitz, M.A., Pariante, C.M., Teixeira, A.L., 2013. Chemokines in bipolar disorder: trait or state? *European Archives of Psychiatry Clinical Neuroscience* 263(2):159-65.
- Biber, K., Zuurman, M.W., Dijkstra, I.N., Boddeke, H.W., 2002. Chemokines in the brain: neuroimmunology and beyond. *Current Opinion in Pharmacology* 2:63–8.
- Brietzke, E., Kauer-Sant'Anna, M., Teixeira, A.L., Kapczinski, F., 2009. Abnormalities in serum chemokine levels in euthymic patients with bipolar disorder. *Brain, Behavior, and Immunity* 23(8):1079e82.
- Charo, I.F., Ransohoff, R.M., 2006. The many roles of chemokines and chemokines receptors in inflammation. *The New England Journal of Medicine* 354:610–21.
- Dean, B., 2011. Understanding the role of inflammatory-related pathways in the pathophysiology and treatment of psychiatric disorders: evidence from human peripheral studies and CNS studies. *International Journal of Neuro-psychopharmacology* 14(7):997e1012.
- Domenici, E., Wille, D.R., Tozzi, F., Prokopenko, I., Miller, S., McKeown, A., Brittain, C., Rujescu, D., Giegling, I., Turck, C.W., Holsboer, F., Bullmore, E.T., Middleton, L., Merlo-Pich, E., Alexander, R.C., Muglia, P., 2010. Plasma protein biomarkers for depression and schizophrenia by multi analyte profiling of case-control collections 5(2):e9166.
- Drexhage, R.C., Padmos, R.C., de Wit, H., Versnel, M.A., Hooijkaas, H., van der Lely, A.J., van Beveren, N., de Rijk, R.H., Cohen, D., 2008. Patients with schizophrenia show raised serum levels of the pro-inflammatory chemokine CCL2: association with the metabolic syndrome in patients? *Schizophrenia Research* 102(1-3):352-5.
- Fernandez-Egea, E., Scoriels, L., Theegala, S., Giro, M., Ozanne, S.E., Burling, K., Jones, P.B.,

2013. Cannabis use is associated with increased CCL11 plasma levels in young healthy volunteers. *Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry* 46C:25-28.

Fujii, H., Shimada, Y., Hasegawa, M., Takehara, K., Sato, S., 2004. Serum levels of a Th1 chemoattractant IP-10 and Th2 chemoattractants, TARC and MDC, are elevated in patients with systemic sclerosis. *Journal of Dermatological Science* 35(1): 43e51.

Gama, C.S., Salvador, M., Andreazza, A.C., Kapczinski, F., Belmonte-de-Abreu, P.S., 2006. Elevated serum superoxide dismutase and thiobarbituric acid reactive substances in schizophrenia: a study of patients treated with haloperidol or clozapine. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 30(3): 512e5.

Gama, C.S., Andreazza, A.C., Kunz, M., Berk, M., Belmonte-de-Abreu, P.S., Kapczinski, F., 2007. Serum levels of brain-derived neurotrophic factor in patients with schizophrenia and bipolar disorder. *Neuroscience Letters* 420(1): 45e8.

Gama, C.S., Berk, M., Andreazza, A.C., Kapczinski, F., Belmonte-de-Abreu, P., 2008a. Serum levels of brain-derived neurotrophic factor and thiobarbituric acid reactive substances in chronically medicated schizophrenic patients: a positive correlation. *Revista Brasileira de Psiquiatria* 30(4):337e40.

Gama, C.S., Salvador, M., Andreazza, A.C., Lobato, M.I., Berk, M., Kapczinski, F., Belmonte-de-Abreu, P., 2008b. Elevated serum thiobarbituric acid reactive substances in clinically symptomatic schizophrenic males. *Neuroscience Letters* 433(3):270e3.

Grassi-Oliveira, R., Brietzke, E., Teixeira, A., Pezzi, J.C., Zanini, M., Lopes, R.P., Bauer, M.E., 2012. Peripheral chemokine levels in women with recurrent major depression with suicidal ideation. *Revista Brasileira de Psiquiatria* 34(1):71e5.

Kao, H.T., Cawthon, R.M., De Lisi, L.E., Bertisch, H.C., Ji, F., Gordon, D., Benedict, M.M., Greenberg, W.M., Porton, B., 2008. Rapid telomere erosion in schizophrenia. *Molecular Psychiatry* 13, 118–119.

Kirkpatrick, B., Messias, E., Harvey, P.D., Fernandez-Egea, E., Bowie, C.R., 2008. Is schizophrenia a syndrome of accelerated aging? *Schizophrenia Bulletin* 34:1024–32.

Kunz, M., Ceresér, K.M., Goi, P.D., Fries, G.R., Teixeira, A.L., Fernandes, B.S., Belmonte-de-Abreu, P., Kauer-Sant'Anna, M., Kapczinski, F., Gama, C.S., 2011. Serum levels of IL-6, IL-10 and TNF- $\alpha$  in patients with bipolar disorder and schizophrenia: differences in pro- and anti-inflammatory balance. *Revista Brasileira de Psiquiatria* 33(3):268e74.

Lieberman, J.A., 1999. Pathophysiologic mechanisms in the pathogenesis and clinical course of schizophrenia. *Journal of Clinical Psychiatry* 60 (Suppl. 12):9e12.

Mansur, R.B., Zugman, A., Asevedo, E.M., da Cunha, G.R., Bressan, R.A., Brietzke, E., 2012. Cytokines in schizophrenia: possible role of anti-inflammatory medications in clinical and preclinical stages. *Psychiatry Clinical Neuroscience* 66(4):247-60.

Miller, B.J., Buckley, P., Seabolt, W., Mellor, A., Kirkpatrick, B., 2011. Meta-analysis of cytokine alterations in schizophrenia: clinical status and antipsychotic effects. *Biological Psychiatry* 70(7):663e71.

Monji, A., Kato, T., Kanba, S., 2009. Cytokines and schizophrenia: Microglia hypothesis of schizophrenia. *Psychiatry and Clinical Neurosciences* 63(3):257-65.

Na, K.S., Jung, H.Y., Kim, Y.K., 2012. The role of pro-inflammatory cytokines in the neuroinflammation and neurogenesis of schizophrenia. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*; Nov 1 [Epub ahead of print].

Ng, F., Berk, M., Dean, O., Bush, A.I., 2008. Oxidative stress in psychiatric disorders: evidence base and therapeutic implications. *International Journal of Neuropsychopharmacology* 11(6):851e76.

Noto, C.S., Gadelha, A., Belangero, S.I., Smith, M.A., de Aguiar, B.W., Panizzuti, B., Mari, J. De J., Gama, C.S., Bressan, R.A., Brietzke, E., 2011. Association of biomarkers and depressive symptoms in schizophrenia. *Neuroscience Letters* 505(3):282e5.

Pedrini, M., Massuda, R., Fries, G.R., de Bittencourt Pasquali, M.A., Schnorr, C.E., Moreira, J.C., Moreira, M.A., Teixeira, A.L., Lobato, M.I.R., Walz, J.C., Belmonte-de-Abreu, P., Kauer-Sant'Anna, M., Kapczinski, F., Gama, C.S., 2012. Similarities in serum oxidative stress markers and inflammatory cytokines in patients with overt schizophrenia at early and late stages of chronicity. *Journal of Psychiatric Research* 46(6):819e24.

Porton, B., Delisi, L.E., Bertisch, H.C., Ji, F., Gordon, D., Li, P., Benedict, M.M., Greenberg, W.M., Kao, H.T., 2008. Telomerase levels in schizophrenia: a preliminary study. *Schizophrenia Research* 106(2-3):242-7.

Potvin, S., Stip, E., Sepehry, A.A., Gendron, A., Bah, R., Kouassi, E., 2008. Inflammatory cytokine alterations in schizophrenia: a systematic quantitative review. *Biological Psychiatry* 63(8):801e8.

Ransohoff, R.M., 2002. The chemokine system in neuroinflammation: an update. *The Journal of Infectious Disease* 186 (suppl 2):S152-6.

Reale, M., Patruno, A., De Lutiis, M.A., Pesce, M., Felaco, M., Di Giannantonio, M., Di Nicola, M., Grilli, A., 2011. Dysregulation of chemo-cytokine production in schizophrenic patients versus healthy controls. *BMC Neuroscience* 12:13.

Romano, F., Elkis, H., 1996. Tradução e Adaptação de um Instrumento de Avaliação Psicopatológica das Psicoses: Escala Breve de Avaliação Psiquiátrica. Versão Ancorada (BPRS-A). *Jornal Brasileiro de Psiquiatria* 45:43e9.

Rostène, W., Kitabgi, P., Parsadaniantz, S.M., 2007. Chemokines: a new class of neuromodulator? *Nature Reviews Neuroscience* 8(11):895-903.

Simon, N.M., Smoller, J.W., McNamara, K.L., Maser, R.S., Zalta, A.K., Pollack, M.H., Nierenberg, A.A., Fava, M., Wong, K.K., 2006. Telomere shortening and mood disorders: preliminary support for a chronic stress model of accelerated aging. *Biological Psychiatry* 60:432-5.

Thakore, J.H., 2004. Metabolic disturbance in first-episode schizophrenia. *The British journal of psychiatry Supplement* 47:S76-79.

Teixeira, A.L., Reis, H.J., Nicolato, R., Brito-Melo, G., Correa, H., Teixeira, M.M., Romano-Silva, M.A., 2008. Increased serum levels of CCL11/eotaxin in schizophrenia. *Progress in NeuroPsychopharmacology & Biological Psychiatry* 32(3):710e4.

Villeda, S.A., Luo, J., Mosher, K.I., Zou, B., Britschgi, M., Bieri, G., Stan, T.M., Fainberg, N., Ding, Z., Eggel, A., Lucin, K.M., Czirr, E., Park, J.S., Couillard-Després, S., Aigner, L., Li, G., Peskind, E.R., Kaye, J.A., Quinn, J.F., Galasko, D.R., Xie, X.S., Rando, T.A., Wyss-Coray, T., 2011. The ageing systemic milieu negatively regulates neurogenesis and cognitive function. *Nature* 477:90–4.

Yatham, L.N., Kapczinski, F., Andreazza, A.C., Trevor Young, , L., Lam, R.W., Kauer-Sant'anna, M., 2009. Accelerated age-related decrease in brain-derived neurotrophic factor levels in bipolar disorder. *The International Journal of Neuropsychopharmacology* 12:137–9.

Yu, W.Y., Chang, H.W., Lin, C.H., Cho, C.L., 2008. Short telomeres in patients with chronic schizophrenia who show a poor response to treatment. *Journal of Psychiatry and Neuroscience* 33(3):244-7.

Watanabe, Y., Someya, T., Nawa, H., 2010. Cytokine hypothesis of schizophrenia pathogenesis: evidence from human studies and animal models. *Psychiatry and Clinical Neurosciences* 64(3):217-30.

**Table 1. Characteristics of healthy controls and patients with schizophrenia**

	Recent Onset (RO)			Chronic Patients (CP)		
	SZ (n=23)	Controls (n=19)	p- value	SZ (n=19)	Controls (n=18)	p-value
<b>Gender</b> (male/female)	13/10	10/9	0.523 <sup>c</sup>	15/4	13/5	0.714 <sup>c</sup>
<b>Age in years</b> <sup>a</sup>	24.70 (4.78)	25.32 (5.19)	0.692 <sup>d</sup>	47.47 (3.41)	46.89 (4.28)	0.650 <sup>d</sup>
<b>Years of education</b> <sup>a</sup>	10.17 (2.57)	11.32 (1.99)	0.112 <sup>d</sup>	10.26 (3.23)	10.39 (3.22)	0.906 <sup>d</sup>
<b>Years of disease</b> <sup>a</sup>	2.52 (1.83)	---	---	25.63 (4.66)	---	---
<b>Number of cigarettes a day</b> None Less than 10	22 1	23 0	0.358 <sup>c</sup>	17 2	17 1	0.580 <sup>d</sup>
<b>Antipsychotic daily dose, in mg of chlorpromazine equivalents<sup>a</sup></b>	400 (194.24)	---	---	624 (203.01)	---	---
<b>BMI<sup>a</sup></b>	25.05 (5.19)	26.31 (5.17)	0.426 <sup>d</sup>	26.66 (2.64)	26.24 (5.46)	0.768 <sup>d</sup>
<b>BPRS total scores</b> <sup>b</sup>	14 (10)	---	---	13 (9)	---	---
<b>CCL11</b> <sup>b</sup>	775.01 (1215.23)	837.04 (696.79)	0.806 <sup>e</sup>	1294.18 (2064.21)	614.59 (726.42)	0.001 <sup>e</sup>
<b>CCL24</b> <sup>b</sup>	5440.03 (5081.67)	3668.58 (2952.29)	0.010 <sup>e</sup>	5382.73 (5676.92)	3087.08 (2947.88)	0.034 <sup>e</sup>

<sup>a</sup> Mean (Standard deviation); <sup>b</sup> Median (interquartile range); <sup>c</sup> Chi-square; <sup>d</sup> T-test; <sup>e</sup> Mann-whitney

## 9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nossos achados fornecem informações importantes sobre os marcadores biológicos em diferentes estágios da esquizofrenia, sugerindo que esta doença está associada a uma ativação pró-inflamatória e a um estado de estresse oxidativo. A partir dos dados apresentados, nossos resultados corroboram a hipótese de que os danos ao sistema nervoso central ocorrem precocemente na esquizofrenia, levando à presença de um componente degenerativo desde o início deste transtorno. Neste estudo, não encontramos diferença tanto nos níveis séricos dos marcadores de estresse oxidativo lipídico e proteico quanto das citocinas nos pacientes com início recente de doença e com esquizofrenia crônica. Esses biomarcadores parecem ter o papel de marcadores de traço de doença e não de estado. Tal observação nos remete à diferenciação clássica entre a esquizofrenia, que cursa com deterioração clínica, e o transtorno de humor bipolar, que tem um curso episódico.

Nossos resultados mostraram que os níveis séricos de TBARS, PCC, IL-6 e CCL-24 estavam aumentados em pacientes com início recente de doença e com esquizofrenia crônica em comparação aos seus controles. Não houve diferença nos níveis séricos de TRAP, marcador de defesa antioxidante, em ambos os estágios da doença em relação aos controles, sugerindo que os pacientes não executam uma ação reativa antioxidante para a lesão que ocorre na doença. Também não ocorreu diferença nos níveis séricos de TNF-alfa em ambos os grupos de pacientes com esquizofrenia em relação aos seus controles. Além disso, os níveis séricos de IL-10 estavam aumentados nos pacientes com esquizofrenia crônica e houve uma tendência ao aumento nos pacientes com início recente de doença comparados aos controles.

Este é um estudo inovador, uma vez que identificou um padrão diferente dos níveis séricos da quimiocina CCL-11 nos estágios precoce e tardio da esquizofrenia. Não ocorreu diferença nos níveis da CCL-11 em pacientes com início recente de doença, porém houve



aumento nos pacientes com esquizofrenia crônica em relação aos seus controles. Este resultado sugere que a CCL-11 pode vir a ser um marcador periférico para o envelhecimento patológico que ocorre na esquizofrenia. Por esta razão, o aumento dos níveis séricos da CCL-11 ocorreu apenas no grupo de pacientes com doença crônica.

Nossa abordagem, no presente estudo, é de que as alterações do sistema inflamatório e o desequilíbrio oxidativo podem funcionar sinergicamente em favor da degeneração neuronal que ocorre na esquizofrenia. Esta hipótese é consistente com as alterações estruturais cerebrais, metabólicas e bioquímicas, que conduzem ao prejuízo da cognição e da funcionalidade, aumento da prevalência de outras doenças clínicas degenerativas e aumento da mortalidade, que se sobrepõem ao diagnóstico da esquizofrenia.

Os resultados desta pesquisa podem ser considerados como objeto de novas investigações prospectivas para confirmar nossos achados. Novos estudos envolvendo marcadores de estresse oxidativo e citocinas em pacientes com esquizofrenia e em populações de alto risco para desenvolver a doença podem ajudar a estratificar os pacientes pelo estágio clínico, conduzindo de uma melhor forma as intervenções terapêuticas. Por fim, um estudo adicional, que relacione o encurtamento do telômero com a CLL-11, pode fornecer uma resposta mais acurada a respeito do papel desta quimiocina na esquizofrenia como um possível marcador de traço de doença, que pode ser particularmente útil na prevenção das consequências do envelhecimento patológico e pode otimizar o tratamento deste transtorno mental.

## 10. ANEXOS

## **10.1 Artigos não relacionados à tese publicados no período do doutorado**

### 10.1.1 Artigo Anexo I (Resumo)

Schizophrenia Research. 2012 Nov;141(2Z3):162Z7.

doi:10.1016/j.schres.2012.08.002.

Effects of omega-3 dietary supplement in prevention of positive, negative and cognitive symptoms: a study in adolescent rats with ketamine-induced model of schizophrenia.

Gama CS, Canever L, Panizzutti B, Gubert C, Stertz L, Massuda R, Pedrini M, de Lucena DF, Luca RD, Fraga DB, Heylmann AS, Deroza PF, Zugno AI.

Laboratory of Molecular Psychiatry, INCT for Translational Medicine, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.  
clarissasgama@gmail.com

Omega-3 has shown efficacy to prevent schizophrenia conversion in ultra-high risk population. We evaluated the efficacy of omega-3 in preventing ketamine-induced effects in an animal model of schizophrenia and its effect on brain-derived neurotrophic factor (BDNF). Omega-3 or vehicle was administered in Wistar male rats, both groups at the 30th day of life for 15days. Each group was split in two to receive along the following 7days ketamine or saline. Locomotor and exploratory activities, memory test and social interaction between pairs were evaluated at the 52nd day of life. Prefrontal-cortex,

hippocampus and striatum tissues were extracted right after behavioral tasks for mRNA BDNF expression analysis. Bloods for serum BDNF were withdrawn 24h after the end of behavioral tasks. Locomotive was increased in ketamine-treated group compared to control, omega-3 and ketamine plus omega-3 groups. Ketamine group had fewer contacts and interaction compared to other groups. Working memory and short and long-term memories were significantly impaired in ketamine group compared to others. Serum BDNF levels were significantly higher in ketamine plus omega-3 group. There was no difference between groups in prefrontal-cortex, hippocampus and striatum for mRNA BDNF expression. Administration of omega-3 in adolescent rats prevents positive, negative and cognitive symptoms in a ketamine animal model of schizophrenia. Whether these findings are consequence of BDNF increase it is unclear. However, this study gives compelling evidence for larger clinical trials to confirm the use of omega-3 to prevent schizophrenia and for studies to reinforce the beneficial role of omega-3 in brain protection.

### 10.1.2 Artigo Anexo II (Resumo)

Value in Health Regional Issues. Dec 2012;1,(2): 244-7

doi: 10.1016/j.vhri.2012.08.001.

Concurrent Validity and Reliability of the Brazilian Version of the Functioning Assessment Short Test in Patients with Schizophrenia

Karine Zortéa, Pedro Vieira da Silva Magalhães, Adriane Ribeiro Rosa, David Freitas de Lucena, Lísia Rejane Guimarães, Lenise Peixoto Petter Francesconi, Mariana Pedrini, Júlio Cesar Walz, Clarissa Severino Gama, Flávio Kapczinski, Paulo Silva Belmonte-de-Abreu.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil.

Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, RS, Brazil.

Many studies have documented the high rates of functional impairment among patients with schizophrenia. The majority of the available instruments used to assess functioning, however, focus on global measures of functional recovery rather than specific domains of psychosocial functioning. Most of these instruments have important limitations regarding use in psychiatry. The aim of the present study was to evaluate the psychometric properties of the Brazilian version of the Functioning Assessment Short Test (FAST) in

patients with schizophrenia. A convenience sample of 107 chronic outpatients with schizophrenia and 108 controls was assessed in a university hospital (Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil). Psychometric properties of FAST (internal consistency, concurrent validity, and test-retest reliability) were analyzed. The internal consistency obtained was high; the Cronbach's alpha was 0.89. FAST total score was higher in patients than in the control group ( $Z = 11.95$ ;  $P < 0.001$ ). FAST test-retest agreement was excellent (intraclass correlation coefficient = 0.93; 95% confidence interval 0.81–0.97). In addition, FAST displayed a positive correlation with the Brief Psychiatric Rating Scale ( $\rho = 0.41$ ;  $P < 0.001$ ) and a negative correlation with the Global Assessment of Functioning scale ( $\rho = -0.71$ ;  $P = 0.001$ ). Psychotic symptoms, comorbidity, and functional and cognitive impairment contribute to the decreased quality of life of patients with schizophrenia. It is important to obtain a valid and reliable instrument that is capable of evaluating the functional domains in this pathology. In this context, FAST showed accurate psychometrics properties and was able to detect functional differences between patients with the diagnosis of schizophrenia and healthy subjects.

### 10.1.3 Artigo Anexo III (Resumo)

Schizophrenia Research. 2013 Jul;147(2Z3):398Z9.

doi:10.1016/j.schres.2013.04.025

Elevated Serum Protein Oxidative Stress in Siblings of Patients with Schizophrenia

Raffael Massuda, Mariana Pedrini, Ramiro Reckziegel, Monise Costanzi, Pamela Ferrari, Carolina Gubert, Clarissa S. Gama

Laboratory of Molecular Psychiatry, INCT for Translational Medicine, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil. Electronic address: rfmassuda@gmail.com.

The impairment in the antioxidant defense in patients with schizophrenia has been shown by many studies and could play an important role in the pathophysiology and development of the disorder. The aim of this study was to examine serum oxidative stress markers in healthy siblings of patients with schizophrenia and compare it with healthy controls. We selected 37 siblings and 37 healthy controls without actual or past psychiatry disorder. We measured thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS), protein carbonyl content (PCC), and glutathione peroxidase activities. We found significant increase in protein oxidative



stress in siblings of patients with schizophrenia (higher PCC levels  $p = 0.030$ ). We haven't found differences in TBARS ( $p = 0.729$ ) and Glutathione Peroxidase activity ( $p = 0.533$ ). The present findings provide additional evidence that increased oxidative stress may be an endophenotype and could be related to the pathophysiology of schizophrenia.

#### 10.1.4 Artigo Anexo IV (Resumo)

Schizophrenia Research. 2013 Sep 10. [Epub ahead of print]

doi: 10.1016/j.schres.2013.08.019.

Verbal memory impairment in healthy siblings of patients with schizophrenia.

Massuda R, Bücker J, Czepielewski LS, Narvaez JC, Pedrini M, Santos BT, Teixeira AS, Souza AL, Vasconcelos-Moreno MP, Vianna-Sulzbach M, Goi PD, Belmonte-de-Abreu P, Gama CS.

Laboratory of Molecular Psychiatry, INCT for Translational Medicine, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.  
rfmassuda@gmail.com.

Cognitive deficits have been recognized as a core feature of schizophrenia (SZ) and are present in most patients. Verbal memory (VM), working memory (WM), and executive function (EF) are domains commonly impaired in patients with SZ. These latter domains have been related to the genetic risk of the disorder characterizing as possible endophenotypes. In order to study neurocognitive endophenotypes in a Brazilian population with elevated genetic risks to develop SZ, we measured VM (Hopkins Verbal Learning Test Revised), WM (Letter-Number Sequencing and Digit Span) and EF (Stroop Test) in 90 subjects (45 unaffected siblings of patients with SZ and 45 matched healthy

controls). No differences were found in EF and WM (Letter-Number Sequencing and Digit Span). However, in VM, siblings of patients performed worse than controls on the immediate recall and delayed recall. Our results suggest that VM impairment could be considered an endophenotype of SZ.

### 10.1.5 Artigo Anexo V (Carta ao Editor)

Revista Brasileira de Psiquiatria. 2013 Apr./June; 35 no.2.

doi:10.1590/1516-4446-2012-1035.

rTMS as an add-on treatment for resistant obsessive-compulsive symptoms in patients with schizophrenia: report of three cases

Vauto Alves Mendes-Filho, Paulo Belmonte-de-Abreu, Mariana Pedrini, Carolina

Tosetto Cachoeira, Maria Inês Rodrigues Lobato

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil.

Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, RS, Brazil.

Dear Editor,

Obsessive-compulsive symptoms (OCSs) occur in approximately 30% of patients with schizophrenia, probably reflecting reduced basal ganglia and prefrontal cortex connectivity, and are associated with poorer prognosis.<sup>1</sup> There is little systematic evidence of treatment effect on OCS schizophrenia, mostly derived from case reports and open label uncontrolled studies. Among new treatments, repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) is a method of noninvasive electromagnetic neurostimulation that has demonstrated effect on verbal hallucinations and depressive symptoms.<sup>2,3</sup> Nevertheless,

contradictory effects on obsessive-compulsive disorder (OCD) have been reported,<sup>2 2,4</sup> depending on the stimulation parameters used (frequency, place, total dose). Furthermore, there has been some evidence of effects on compulsions using the Mantovani's protocol (1 Hz over the supplementary motor area - SMA),<sup>5</sup> whilst dorsolateral prefrontal cortex failed to reveal consistent effect even at low or high frequency, and right or left hemisphere. We report on three cases of comorbid schizophrenia or schizoaffective disorder and OCS under stable dose of neuroleptics receiving additional rTMS with the Mantovani protocol (1 Hz, SMA, 100% of motor threshold, 20 minutes, 20 sessions in 4 weeks), showing reduced OCSs after rTMS treatment. The protocol was approved by the Ethics Committee of the HCPA (Hospital de Clínicas de Porto Alegre - GPPG 10-0426), and patients and relatives provided informed consent.

All cases had treatment-resistant schizophrenia (n=2) or schizoaffective disorder (n=1) with at least 3 months under stable dose of clozapine. Diagnosis was based on the DSM-IV-TR criteria administered by the same trained psychiatrist (VMF) and reviewed by a senior psychiatrist (MIRL). Psychopathology was measured by the 18-item Brief Psychiatric Rating Scale (BPRS) and the Yale-Brown Obsessive Compulsive Scale (Y-BOCS). The characteristics of the three cases are described in Table 1. All subjects displayed improvement on the BPRS and OCD symptoms after the add-on rTMS treatment, but with subsequent relapse after 4 weeks (Table 1).

As far as we are aware, this is the first report of the effects of add-on rTMS on the treatment of OCSs in refractory schizophrenia. These three cases provide initial evidence for the use of the Mantovani protocol (SMA) in this group of patients, in addition to previous effects of rTMS on auditory hallucinations.<sup>2 2,3.</sup>

This report must be viewed as initial evidence requiring further studies with larger number of cases and double-blind sham control group. The number of cases (n=3) precluded statistical testing and displayed relatively large age, gender and diagnosis heterogeneity. Nevertheless, despite the limitations that hinder further generalization, patient diagnosis and psychopathology were consistently assessed, and cases had no significant variations in terms of drug dose and psychosocial environment over the observational period. This reinforces the need of additional studies with larger sample size, less variability of age, gender and diagnosis, longer follow-up, and use of additional tools (functional magnetic resonance imaging-positron emission tomography, fMRI-PET) to elucidate efficacy, duration, and underlying mechanisms of action of the rTMS treatment<sup>5</sup> in comorbid schizophrenia-schizoaffective disorder-OCS.

### 10.1.6 Artigo Anexo VI (Resumo)

Journal of Psychiatry Research. 2013 Oct;47(10):1546-8.

doi: 10.1016/j.jpsychires.2013.04.012.

Serum concentrations of brain-derived neurotrophic factor in patients with gender identity disorder.

Fontanari AM, Andreazza T, Costa ÂB, Salvador J, Koff WJ, Aguiar B, Ferrari P, Massuda R, Pedrini M, Silveira E, Belmonte-de-Abreu PS, Gama CS, Kauer-Sant'Anna M, Kapczinski F, Lobato MI.

Gender Identity Disorder Program, Hospital de Clinicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

Gender Identity Disorder (GID) is characterized by a strong and persistent cross-gender identification that affects different aspects of behavior. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) plays a critical role in neurodevelopment and neuroplasticity. Altered BDNF-signaling is thought to contribute to the pathogenesis of psychiatric disorders and is related to traumatic life events. To examine serum BDNF levels, we compared one group of DSM-IV GID patients (n = 45) and one healthy control group (n = 66). Serum BDNF levels were significantly decreased in GID patients (p = 0.013). This data support the hypothesis that

the reduction found in serum BDNF levels in GID patients may be related to the psychological abuse that transsexuals are exposed during their life.



**10.2 Escala BPRS (Brief Psychiatric Rating Scale)**

Associação Brasileira de Psiquiatria – Escala de Medida de Psicose: Escala Breve de Avaliação Psiquiátrica  
 Versão Ancorada (BPRS-A (Woerner, 1998, tradução de Romano e Elkis, 1996) associada a Entrevista Clínica  
 Estruturada (SIG-BPRS) de Rhoades e Overall (1988)

Paciente:	Número	Data:
Entrevistador:	Registro:	Fase do estudo:
Instruções: A escala é composta de 18 itens a serem avaliados. Os itens assinalados com <b>OBSERVAÇÃO</b> (3, 4, 7, 13, 14, 16, 17, 18) devem ser avaliados tomando por base OBSERVAÇÕES feitas durante a entrevista. Os itens assinalados com <b>RELATO DO PACIENTE</b> devem ser avaliados a partir de informação RELATADA (ou seja, SUBJETIVA) referente ao período escolhido (em geral 1 semana). As perguntas-guia em negrito devem ser formuladas diretamente nos itens em que se avalia a relato do paciente.  <i><b>Início da entrevista:</b> comece com estas perguntas e utilize as respostas às mesmas para completar o item 18 (Orientação) Qual o seu nome completo? E sua idade? Onde você mora? Está trabalhando atualmente? (Já trabalhou anteriormente? Em quê?): Quanto tempo faz que você está aqui? Conte-me por que motivo você foi internado. Quando isso começou? O que aconteceu depois? Você pode me dizer que dia é hoje? (semana- mês- ano)?</i>		

1	<b>RELATO DO PACIENTE</b>	<p><b>Preocupação Somática:</b> Grau de preocupação com a saúde física. Avaliar o grau no qual a saúde física é percebida como um problema pelo paciente, quer as queixas sejam baseadas na realidade ou não. Não pontuar o simples relato de sintomas físicos. Avaliar apenas apreensão (ou preocupação) sobre problemas físicos (reais ou imaginários)</p> <p><i>Pergunta-Guia</i> Como costuma ser sua saúde física (do corpo)? Como esteve a sua saúde no último ano? Você está preocupado com algum problema de saúde agora? Você sente que tem alguma coisa incomum acontecendo com seu corpo ou cabeça?</p> <p>0 Não relatado                  1 <b>Muito leve:</b> Ocasionalmente fica levemente preocupado com o corpo, sintomas ou doenças físicas.                  2 <b>Leve:</b> Ocasionalmente fica preocupado com o corpo de forma moderada, ou freqüentemente fica levemente apreensivo.                  3                  4 <b>Moderado:</b> Ocasionalmente muito preocupado ou moderadamente preocupado com freqüência.                  5 <b>Moderadamente Grave:</b> Freqüentemente muito preocupado.                  6 <b>Grave:</b> Fica muito preocupado a maior parte do tempo.  <b>Muito Grave:</b> Fica muito preocupado praticamente o tempo todo.</p>
2	<b>RELATO DO PACIENTE</b>	<p><b>ANSIEDADE:</b> Preocupação, medo ou preocupação excessiva acerca do presente ou futuro. <b>Pontuar somente a partir de relato verbal das experiências subjetivas do paciente.</b> Não inferir ansiedade a partir de sinais físicos ou mecanismos de defesa neuróticos. Não pontuar se restrito a preocupação somática.</p> <p><i>Pergunta-Guia</i> Você está preocupado com alguma coisa? Você tem se sentido tenso ou ansioso a maior parte do tempo? (quando se sente assim, você consegue saber o porque? De que forma as suas ansiedades ou preocupações afetam o seu dia-dia? Existe algo que ajuda a melhorar essa sensação?).</p> <p>0 Não relatado                  1 <b>Muito leve:</b> Ocasionalmente se sente levemente ansioso.                  2 <b>Leve:</b> Ocasionalmente se sente moderadamente ansioso ou freqüentemente se sente levemente ansioso.                  3 <b>Moderado:</b> Ocasionalmente se sente muito ansioso ou freqüentemente se sente moderadamente ansioso.                  4 <b>Moderadamente Grave:</b> Freqüentemente se sente muito ansioso                  5 <b>Grave:</b> Sente-se muito ansioso a maior parte do tempo.</p>
3	<b>OBSERVAÇÃO DO PACIENTE</b>	<p><b>RETRAIMENTO AFETIVO:</b> Deficiência no relacionamento com o entrevistador e na situação da entrevista. Manifestações evidentes dessa deficiência incluem: falta de contato visual (troca de olhares); o paciente não se aproxima do entrevistador; apresenta uma falta de envolvimento e compromisso com a entrevista. Diferenciar de AFETO EMBOTADO, no qual são pontuados deficiências na expressão facial, gestualidade, e tom de voz. <b>Pontuar a partir de observações feitas durante a entrevista.</b></p> <p>0 Não observado                  1 <b>Muito leve:</b> Ex: ocasionalmente deixa de encarar o entrevistador.                  2 <b>Leve:</b> Ex: como acima, porém mais freqüente.                  3 <b>Moderado:</b> Ex: demonstra dificuldade em encarar o entrevistador, mas ainda parece engajado na entrevista e responde apropriadamente a todas as questões.                  4 <b>Moderadamente Grave:</b> Ex: olha fixamente no chão e afasta-se do entrevistador mas ainda parece moderadamente engajado na entrevista.                  5 <b>Grave:</b> Ex: como acima, porém mais persistente e disseminado.                  6 <b>Muito Grave:</b> Ex: parece estar “aéreo”, “nas nuvens” ou “viajando” (total ausência de vínculo emocional) e desproporcionalmente não-envolvido u não-comprometido com situação da entrevista (Não pontuar se explicado pela desorientação)</p>
4	<b>OBSERVAÇÃO DO PACIENTE</b>	<p><b>DESORGANIZAÇÃO CONCEITUAL:</b> Grau de incompreensibilidade da fala. Incluir qualquer tipo de desordem formal de pensamento (p.ex, associações frouxas, incoerência, fuga de idéias, neologismos). <b>NÃO</b> incluir mera circunstancialidade ou fala maníaca, mesmo que acentuada. <b>NÃO</b> pontuar a partir de impressões subjetivas do paciente (p.ex: “Meus pensamentos estão voando”, “Não consigo manter o pensamento”, “Meus pensamentos se misturam todos”). <b>Pontuar SOMENTE a partir de observações feitas durante a entrevista.</b></p>

0	Não observado.
1	Muito leve: Ex: levemente vago, todavia de significação clínica duvidosa.
2	Leve: Ex: freqüentemente vago, mas é possível prosseguir a entrevista.
3	Moderado: Ex: ocasionalmente faz afirmações irrelevantes; uso infreqüente de neologismos; ou associações moderadamente frouxas.
4	Moderadamente Grave: Como acima, porém mais freqüente.
5	Grave: Desordem formal do pensamento presente a maior parte da entrevista, tornando-a muito difícil.
6	Muito Grave: Muito pouca informação coerente pode ser obtida.

5	RELATO DO PACIENTE	SENTIMENTOS DE CULPA: Preocupação ou remorso desproporcional pelo passado. <b>Pontuar a partir das experiências subjetivas de culpa evidenciadas por meio de relato verbal.</b> Não inferir sentimentos de culpa a partir de depressão, ansiedade ou defesas neuróticas.
	<i>Pergunta-Guia</i>	<i>Nos últimos dias você tem se sentido um peso pára sua família ou colegas? Você tem se sentido culpado por alguma coisa feita no passado? Você acha que o que você está passando agora é um tipo de castigo? (Por que você acha isso?)</i>
		0 Não relatado 1 Muito leve: Ocasionalmente se sente levemente culpado. 2 Leve: Ocasionalmente se sente moderadamente culpado; ou freqüentemente se sente levemente culpado. 3 Moderado: Ocasionalmente se sente muito culpado; ou freqüentemente se sente moderadamente culpado 4 Moderadamente Grave: freqüentemente se sente muito culpado. 5 Grave: Sente-se muito culpado a maior parte o tempo ou apresenta delírio de culpa encapsulado. 6 Muito Grave: Sentimento de culpa angustiante e constante; ou delírios de culpa disseminados.
6	OBSERVAÇÃO DO PACIENTE	TENSÃO: Avaliar inquietação motora (agitação) observada durante a entrevista. Não pontuar a partir de experiências subjetivas relatadas pelo paciente. Desconsiderar patogênese presumida (p.ex: discinesia tardia).
		0 Não observado. 1 Muito leve: Ex: ocasionalmente agitado 2 Leve: Ex: freqüentemente agitado. 3 Moderado: Ex: agita-se constantemente ou freqüentemente. Torce as mãos e puxa a roupa. 4 Moderadamente Grave: Ex: agita-se constantemente. Torce as mãos e puxa a roupa. 5 Grave: Ex: não consegue ficar sentado, isto é, precisa andar. 6 Muito Grave: anda de maneira frenética
7	OBSERVAÇÃO DO PACIENTE	MANEIRISMOS E POSTURA: comportamento motor incomum ou não natural. <b>Pontuar apenas anormalidade de movimento;</b> não pontuar aqui simples aumento da atividade motora. Considerar freqüência, duração e grau do caráter bizarro. Desconsiderar patogênese presumida.
		0 Não observado 1 Muito leve: Comportamento estranho, mas de significação clínica duvidosa, por exemplo, um riso imotivado 2 ocasional, movimentos de lábio infreqüentes. Leve: Comportamento estranho, mas não obviamente bizarro, por exemplo, às vezes balança a cabeça ritmadamente de um lado para outro, movimentam os dedos de maneira anormal intermitentemente. 3 Moderado: Ex: adota posição de loga por um breve período, às vezes põe a língua para fora, balança o corpo. 4 Moderadamente Grave: Como acima, porém mais freqüente, intenso ou disseminado. 5 Grave: Como acima, porém mais freqüente, intenso ou disseminado. 6 Muito Grave: Ex: postura bizarra durante a maior parte da entrevista, movimentos anormais constantes em várias áreas do corpo.
8	RELATO DO PACIENTE	IDÉIAS DE GRANDEZA: Auto-Estima (autoconfiança) exagerada, ou apreciação desmedida dos próprios talentos, poderes, habilidades, conquistas, conhecimento, importância ou identidade. Não pontuar mera qualidade grandiosa de alegações (p. ex.: "sou o pior pecador do mundo", "todo o país está tentando me matar") a menos que a culpa/perseguição esteja relacionada a algum atributo especial exagerado do indivíduo. O paciente deve declarar atributos exagerados; se o paciente nega talentos, poderes, etc, mesmo que ele afirme que outros digam que ele possui estas qualidades, este item não deve ser pontuado Pontuar a partir de informação relatada, ou seja, subjetiva.
	<i>Pergunta-Guia</i>	<i>Nos últimos dias você tem se sentido com algum talento ou habilidade que a maioria das pessoas não tem? (como você sabe disso?) Você acha que as pessoas têm tido inveja de você? Você tem acreditado que tenha alguma coisa importante para fazer no mundo?</i>
		0 Não relatado 1 Muito leve: Ex: é mais confiante que a maioria, mas isso é apenas de possível significância clínica. 2 Leve: Auto-estima definitivamente aumentada ou talentos exagerados de modo levemente desproporcional às circunstâncias. 3 Moderado: Auto-estima aumentada de modo claramente desproporcional às circunstâncias, ou suspeita-se de delírio de grandeza. 4 Moderadamente Grave: Ex: um único (e claramente definido) delírios de grandeza encapsulados ou múltiplos delírios de grandeza fragmentários (claramente definidos). 5 Grave: Ex: um único, ou claros delírios/ sistema delirantes ou múltiplos e claros delírios de grandeza com os quais o paciente parece preocupado. 6 Muito Grave: Ex: como acima, mas a quase-totalidade da conversa é dirigida aos delírios de grandeza do paciente.

9	RELATO DO PACIENTE	<b>HUMOR DEPRESSIVO:</b> Relato subjetivo de sentimento de depressão, tristeza, "estar na fossa", etc. Pontuar apenas o grau de depressão relatada. Não pontuar inferências de depressão feitas a partir de identificação geral e queixas somáticas. <b>Pontuar a partir de informação relatada, ou seja, subjetiva.</b>
	Pergunta-Guia	<i>Como tem estado o seu humor (alegre, triste, irritável)? Você acredita que pode melhorar? (como esse sentimento tem afetado o seu dia-dia?)</i>
		0 <b>Não relatado</b> 1 <b>Muito leve:</b> Ocasionalmente se sente levemente deprimido. 2 <b>Leve:</b> Ocasionalmente se sente moderadamente deprimido, ou freqüentemente se sente levemente deprimido. 3 <b>Moderado:</b> Ocasionalmente se sente muito deprimido, ou freqüentemente se sente moderadamente deprimido. 4 <b>Moderadamente Grave:</b> Freqüentemente se sente muito deprimido 5 <b>Grave:</b> Sente-se muito deprimido a maior parte do tempo. 6 <b>Muito Grave:</b> Sente-se muito deprimido quase todo o tempo.
10	RELATO DO PACIENTE	<b>HOSTILIDADE:</b> Animosidade, desprezo, agressividade, desdém por outras pessoas fora da situação da entrevista. <b>Pontuar somente a partir de relato verbal de sentimentos e atos do paciente em relação aos outros.</b> Não inferir hostilidade a partir de defesas neuróticas, ansiedade ou queixas somáticas.
	Pergunta-Guia	<i>Nos últimos dias você tem estado impaciente ou irritável com as outras pessoas? (conseguiu manter o controle? Tolerou as provocações? Chegou a agredir alguém ou quebrar objetos?)</i>
		0 <b>Não relatado</b> 1 <b>Muito leve:</b> Ocasionalmente sente um pouco de raiva. 2 <b>Leve:</b> Freqüentemente sente um pouco de raiva, ou ocasionalmente sente raiva moderada. 3 <b>Moderado:</b> Ocasionalmente sente muita raiva; ou freqüentemente sente raiva moderada. 4 <b>Moderadamente Grave:</b> Freqüentemente sente muita raiva. 5 <b>Grave:</b> Atuou sua raiva tornando-se verbal ou fisicamente agressivo em uma ou duas ocasiões. 6 <b>Muito Grave:</b> Atuou sua raiva em várias ocasiões.
11	RELATO DO PACIENTE	<b>DESCONFIANÇA:</b> Crença (delirante ou não) de que outros têm agora ou tiveram no passado intenções discriminatórias ou maldosas em relação a paciente. Pontuar apenas se o paciente relatar verbalmente desconfianças atuais, quer elas se refiram a circunstâncias presentes ou passadas. <b>Pontuar a partir da informação relatada, ou seja, subjetiva.</b>
	Pergunta-Guia	<i>Você tem tido a impressão de que as outras pessoas estão falando ou rindo de você? (de que forma você percebe isso?) Você tem achado que tem alguém com más intenções contra você ou se esforçado para lhe causar problemas? (Quem? Por que? Como você sabe disso?)</i>
		0 <b>Não relatado</b> 1 <b>Muito leve:</b> Raras circunstâncias de desconfiança que podem ou não corresponder à realidade. 2 <b>Leve:</b> Situações de desconfiança ocasionais que definitivamente não correspondem à realidade. 3 <b>Moderado:</b> Desconfiança mais freqüente; ou idéias de referência passageiras. 4 <b>Moderadamente Grave:</b> Desconfiança disseminada; ou idéias de referência freqüentes. 5 <b>Grave:</b> claros delírios de perseguição ou referência não totalmente disseminados (p. ex. um delírio encapsulado). 6 <b>Muito Grave:</b> como acima, porém mais abrangente, freqüente, ou intenso.
12	RELATO DO PACIENTE	<b>COMPORTAMENTO ALUCINATÓRIO (ALUCINAÇÕES):</b> Percepções (em qualquer modalidade dos sentidos) na ausência de um estímulo externo identificável. <b>Pontuar apenas as experiências que ocorrem na última semana:</b> Não pontuar "vozes na minha cabeça", ou "visões em minha mente" a menos que o paciente saiba diferenciar entre essas experiências e seus pensamentos.
	Pergunta-Guia	<i>Você tem tido experiências incomuns, que a maioria das pessoas não tem? Você tem escutado coisas que as outras pessoas não podem ouvir?(você estava acordado neste momento? O que você ouvia [barulhos, cochichos, vozes conversando com você ou conversando entre si]? Com que freqüência? Interferem no seu dia-dia?) Você tem visto coisa que a maioria das pessoas não podem ver? (Você estava acordado nesse momento? O que você via [luzes, formas, imagens]? Com que freqüência? Interferem no seu dia-dia?)</i>
		0 <b>Não relatado</b> 1 <b>Muito leve:</b> Apenas se suspeita de alucinação 2 <b>Leve:</b> Alucinações definidas, porém insignificantes, infreqüentes, ou transitórias. 3 <b>Moderado:</b> Como acima, porém mais freqüentes (p. ex: freqüentemente vê a cara do diabo; duas vezes travam uma longa conversa) 4 <b>Moderadamente Grave:</b> As alucinações são experimentadas quase todo o dia, ou são fontes de incômodo extremo. 5 <b>Grave:</b> Como acima e exerceu impacto moderado no comportamento do paciente (p.ex: dificuldades de concentração que levam a um comprometimento no trabalho). 6 <b>Muito Grave:</b> como acima, com grave impacto (p.ex.: tentativas de suicídio como resposta a ordens alucinatórias).
13	OBSERVAÇÃO DO PACIENTE	<b>RETARDAMENTO MOTOR:</b> Redução do nível de energia evidenciada por movimentos mais lentos. <b>Pontuar apenas a partir de comportamento observado no paciente.</b> Não pontuar a partir de impressões subjetivas do paciente sobre seu próprio nível de energia.
		0 <b>Não observado</b> 1 <b>Muito leve:</b> Significação clínica duvidosa. 2 <b>Leve:</b> Ex conversa um pouco mais lentamente, movimentos levemente mais lentos. 3 <b>Moderado:</b> Ex: conversa notavelmente mais lenta, mas não arrastada. 4 <b>Moderadamente Grave:</b> Ex: conversa é arrastada, movimenta-se muito lentamente. 5 <b>Grave:</b> Ex: é difícil manter a conversa, quase não se movimenta. 6 <b>Muito Grave:</b> Ex: conversa é quase impossível, ou paciente não se move durante toda a entrevista.
14	OBSERVAÇÃO DO PACIENTE	<b>FALTA DE COOPERAÇÃO COM A ENTREVISTA:</b> Evidência de resistência, indelicadeza, ressentimento e falta de prontidão para cooperar com o entrevistados. <b>Pontuar exclusivamente a partir das atitudes do paciente e das reações ao entrevistador e à situação de entrevista.</b> Não pontuar a partir de relato de ressentimento e recusa à cooperação fora de situação de entrevista.

		<p>0 <b>Não observado</b></p> <p>1 <b>Muito leve:</b> Ex: não parece motivado.</p> <p>2 <b>Leve:</b> Ex: parece evasivo em certos assuntos.</p> <p>3 <b>Moderado:</b> Ex: monossilábico, fracassa em cooperar espontaneamente.</p> <p>4 <b>Moderadamente Grave:</b> Ex: expressa ressentimento e é indelicado durante a entrevista.</p> <p>5 <b>Grave:</b> Ex: recusa-se a responder à algumas questões.</p> <p>6 <b>Muito Grave:</b> Ex: recusa-se a responder à maior parte das questões</p>
15	RELATO DO PACIENTE	<p><b>ALTERAÇÃO DE CONTEÚDO DO PENSAMENTO-DELÍRIOS:</b> Gravidade de qualquer tipo de delírio – considerar convicção e seu efeito em ações. Pressupor convicção total se o paciente agiu baseado em suas crenças. <b>Pontuar a partir de informação relatada, ou seja, subjetiva.</b></p>
	Pergunta-Guia	<p>Você tem acreditado que alguém ou alguma coisa fora de você esteja controlando seus pensamentos ou suas ações contra a sua vontade? Você tem a impressão de que o rádio ou a televisão mande mensagens para você? Você sente que alguma coisa incomum esteja acontecendo ou está para acontecer?</p>
		<p>0 <b>Não relatado</b></p> <p>1 <b>Muito leve:</b> suspeita-se ou há probabilidade de delírio.</p> <p>2 <b>Leve:</b> às vezes o paciente questiona suas crenças (delírios parciais).</p> <p>3 <b>Moderado:</b> Plena convicção delirante, porém delírios têm pouca ou nenhuma influência sobre o comportamento.</p> <p>4 <b>Moderadamente Grave:</b> Plena convicção delirante, porém os delírios têm impacto apenas ocasional sobre o comportamento.</p> <p>5 <b>Grave:</b> Delírios têm efeito significativo; por exemplo, negligencia responsabilidades por causa de preocupações com a crença de que é Deus.</p> <p>6 <b>Muito Grave:</b> Delírios têm impactos marcantes, por exemplo, para de comer porque acredita que a comida está envenenada.</p>
16	OBSERVAÇÃO DO PACIENTE	<p><b>AFETO EMBOTADO:</b> Responsividade afetiva diminuída, caracterizada por déficits na expressão facial, gestualidade e tom de voz. Diferenciar de RETRAIMENTO AFETIVO no qual o foco está no comprometimento interpessoal mais do que no afetivo. Considerar grau e consistência no comprometimento. <b>Pontuar a partir de observações feitas durante a entrevista.</b></p>
		<p>0 <b>Não observado</b></p> <p>1 <b>Muito leve:</b> Ex: ocasionalmente parece indiferente a assuntos que são normalmente acompanhados por demonstração de emoção.</p> <p>2 <b>Leve:</b> Ex: expressão facial levemente diminuída ou voz levemente monótona ou gestualidade levemente limitada.</p> <p>3 <b>Moderado:</b> Ex: como acima, porém mais intenso, prolongado ou freqüente.</p> <p>4 <b>Moderadamente Grave:</b> Ex: achatamento de afeto, incluindo pelo menos duas ou três características: falta acentuada de expressão facial, voz monótona ou gestualidade limitada</p> <p>5 <b>Grave:</b> Ex: profundo achatamento de afeto.</p> <p>6 <b>Muito Grave:</b> Ex: voz totalmente monótona e total falta de gestualidade expressiva durante toda a avaliação.</p>
17	OBSERVAÇÃO DO PACIENTE	<p><b>EXCITAÇÃO:</b> Tom emocional aumentado, incluindo irritabilidade e expansividade (afeto hipomaniaco). Não inferir afeto de afirmações a partir de delírios de grandeza. <b>Pontuar a partir de observações feitas durante a entrevista.</b></p>
		<p>0 <b>Não observado</b></p> <p>1 <b>Muito leve:</b> Significação clínica duvidosa.</p> <p>2 <b>Leve:</b> Ex: às vezes irritadiço ou expansivo.</p> <p>3 <b>Moderado:</b> Freqüentemente irritadiço ou expansivo.</p> <p>4 <b>Moderadamente Grave:</b> Ex: Constantemente irritadiço ou expansivo às vezes enfurecido ou eufórico.</p> <p>5 <b>Grave:</b> Ex: Enfurecido ou eufórico a maior parte da entrevista.</p> <p>6 <b>Muito Grave:</b> Ex: como acima, porém de tal modo que a entrevista precisa ser interrompida prematuramente.</p>
18	OBSERVAÇÃO DO PACIENTE	<p><b>DESORIENTAÇÃO:</b> confusão ou falta de orientação adequada em relação às pessoas, lugares e tempo. <b>Pontuar a partir de observações feitas durante a entrevista.</b></p>
	Pergunta-Guia	<p><b>Primeira avaliação:</b> Qual o seu nome completo? E sua idade? Onde você mora? Está trabalhando atualmente? (Já trabalhou anteriormente? Em quê?) Quanto tempo faz que você está aqui? Conte-me por que motivo você foi internado. Quando isso começou? O que aconteceu depois? Você pode me dizer que dia é hoje? (semana- mês- ano)? Você tem conseguido se concentrar? Como está sua memória? <b>(Caso necessário faça exame específico).</b></p> <p><b>Re-entrevista:</b> Você pode me dizer que dia é hoje? (semana- mês- ano)? Você pode me dizer o que tinha ontem no jantar?</p>
		<p>0 <b>Não observado</b></p> <p>1 <b>Muito leve:</b> Ex: parece um pouco confuso.</p> <p>2 <b>Leve:</b> Ex: indica 2003 quando é na verdade 2004.</p> <p>3 <b>Moderado:</b> Ex: indica 1992.</p> <p>4 <b>Moderadamente Grave:</b> Ex: não sabe ao certo onde está.</p> <p>5 <b>Grave:</b> Ex: não faz idéia onde está.</p> <p>6 <b>Muito Grave:</b> Ex: não sabe quem é.</p>