

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós – Graduação em Medicina: Ciências Médicas

TESE DE DOUTORADO

ESTRESSE OXIDATIVO EM ESQUIZOFRENIA

Autora: Clarissa Severino Gama

Orientador: Prof. Dr. Paulo Silva Belmonte-de-Abreu

Porto Alegre
2004

“Schizophrenia is a uniquely human illness. Although none of us know to what extent our perception of the world is merely a construct of our minds, persons with schizophrenia are confronted with this existential dilemma throughout most of their lives”.

G. Berkeley

“O viajante deve estar consciente de que a ilha que vê talvez não seja a mesma que outros vêem, pois a paisagem reflete a experiência do mundo de cada visitante”.

Umberto Eco, *La Isola del Giorno Primo*

AGRADECIMENTOS

Foi dito pelo poeta Mario Quintana: *“Os livros não modificam o mundo, mas estes modificam os homens, que modificam o mundo!”*.

A propósito deste dizer e da minha crença de que o conhecimento é o grande responsável pela melhora da vida das pessoas no sentido humano, científico e social; gostaria de agradecer aos seguintes, por terem me instigado, das formas mais diversas, nas mais diversas épocas, à busca do saber:

- Dr. Ravardière Batista Gama e Maria Conceição Severino Gama;
- Adão Oly Severino e Elocy Bernardes Severino;
- Rafael e Rodrigo Severino Gama;
- Prof. Dr. Paulo Belmonte de Abreu;
- Dra. Maria Inês Rodrigues Lobato;
- Dra. Rosângela da Rosa Minuzzi;
- Prof. Dr. Flavio Danni Fuchs;
- Equipe de trabalho do Ambulatório de Esquizofrenia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre;
- Pacientes, os principais responsáveis pela realização desta tese!

Quero também agradecer a Ana Cristina Andreatza e Mirian Salvador do Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, por terem dosado as amostras

plasmáticas; e, ao Dr. Flavio Kapczinski, por ter feito a aproximação das duas Universidades.

À psicóloga Daniela Laitano, pelo incansável e meticuloso trabalho na construção do banco de dados.

Aos meus amigos, pois mesmo não os vendo cotidianamente, o fato de saber que vocês existem me deixa feliz e tranqüila!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS DA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

LISTA DE TABELAS DA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO DA LITERATURA	12
2.1 Esquizofrenia.....	12
2.1.1 <i>Diagnóstico</i>	12
2.1.2 <i>Tratamento</i>	15
2.2 Radicais livres.....	16
2.3 Mecanismos antioxidantes.....	19
2.4 Estresse oxidativo.....	20
2.5 Estresse oxidativo e neuropatologia.....	22
3. OBJETIVOS	26
4. REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA	28
5. ARTIGO CIENTÍFICO EM INGLÊS (Estudo 1)	33
6. ARTIGO CIENTÍFICO EM PORTUGUÊS (Estudo 1)	49
7. ARTIGO CIENTÍFICO EM INGLÊS (Estudo 2)	65
8. ARTIGO CIENTÍFICO EM PORTUGUÊS (Estudo 2)	85
9. ARTIGO CIENTÍFICO EM INGLÊS (Estudo 3)	106

10. ARTIGO CIENTÍFICO EM PORTUGUÊS (Estudo 3)	126
11. ANEXOS	146
11.1 Opcrit.....	147
11.1.1 <i>Descrição de critérios de pontuação</i>	147
11.1.2 <i>Informações</i>	154
11.2 Escala BPRS (Brief Psychiatric Rating Scale).....	156
11.3 Consentimento Informado.....	157
11.3.1 - <i>Termo de consentimento informado para pacientes</i>	157
11.3.2 - <i>Termo de consentimento informado para voluntários saudáveis</i>	159

LISTA DE ABREVIATURAS

SOD	Superóxido Dismutase
TBARS	Produtos de Reação com o Ácido Tiobarbitúrico
BPRS	Brief Psychiatric Rating Scale
CAT	Catalase
GSH-Px	Glutathione Peroxidase
MDA	Malondialdeído
DSM-IV	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, fourth Edition
RL	Radicais Livres
AODS	Sistema de Defesa Antioxidante
EAO	Espécies Ativas de Oxigênio
<u>PLA2</u>	Fosfolipase A2
SNC	Sistema Nervoso Central

LISTA DE FIGURAS DA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- FIGURA 2.2.1** – Principais alterações celulares geradas pelo estresse oxidativo (adaptado de Andrezza et al., 2004 In: Bases Biológicas dos Transtornos Psiquiátricos).....17
- FIGURA 2.2.2** - Esquema demonstrativo de mecanismos patológicos independentes que podem levar a formação de radicais livres e a consequente patologia de membrana (adaptado de Reddy & Yao, 1999 In: Phospholipid Spectrum Disorder in Psychiatry).....18
- FIGURA 2.3.1** - Representação esquemática das enzimas que protegem contra o processo oxidativo na via que leva os radicais de superóxido à peroxidação lipídica (adaptado de Reddy & Yao, 1999 In: Phospholipid Spectrum Disorder in Psychiatry).....20
- FIGURA 2.5.1** - Esquema demonstrativo de mecanismos provocados pelo estresse oxidativo que podem mediar o dano neuronal, levando a distúrbios de comportamento (adaptado de Reddy & Yao, 1999 In: Phospholipid Spectrum Disorder in Psychiatry).....25

LISTA DE TABELAS DA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

TABELA 2.1.1.1 - Critérios diagnósticos para esquizofrenia pelo DSM-IV.....	12
--	-----------

1 – INTRODUÇÃO

A esquizofrenia é uma doença mental crônica, caracterizada por distorções do pensamento, delírios bizarros, alterações na sensopercepção e respostas emocionais inadequadas, que levam o paciente a algum grau de deterioração. Estes sintomas ocorrem com o paciente lúcido, mas geralmente levam a uma diminuição da capacidade intelectual.

Crítérios diagnósticos claros baseados em características fenomenológicas são apresentados no DSM IV (APA, 1994). Estes são alucinações auditivas de tipos específicos, como vozes repetindo ou antecipando pensamentos dos pacientes, comentando os pensamentos ou condutas, discutindo a respeito do paciente na 3ª pessoa ou vozes de comando. Quanto aos sintomas do pensamento, estes se referem a pessoas lendo os pensamentos ou inserção do pensamento. Há ainda ações, impulsos e sentimentos expressados que parecem ser controlados.

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

A causa da esquizofrenia é desconhecida tendo muitas hipóteses etiológicas para tal, como fatores genéticos, epidemias virais durante a gestação, época de nascimento, traumatismos de parto, infecções perinatais, condições neurológicas ou neuropsiquiátricas que geram sintomas tipo esquizofrênicos ou desenvolvimento anormal (avaliados por

testes psicológicos, estudos de neuroimagem e neuropatológicos que sugerem alterações no desenvolvimento cerebral). Estudos que permitam avançar no entendimento da psicopatologia deste grupo de pacientes certamente são de maior importância, na medida que proporcionarão futuras tentativas terapêuticas.

2 – REVISÃO DA LITERATURA

2.1 - Esquizofrenia

2.1.1 - Diagnóstico

A esquizofrenia é difícil de ser definida ou descrita. Não existem traços patognomônicos, mas sintomas característicos que indicam uma desorganização da personalidade do paciente. A doença interfere, de uma forma geral, nos pensamentos, emoções, motivações e comportamento motor da pessoa. Os sintomas estão divididos em grandes grupos: positivos ou floridos e negativos ou defeituosos. Os primeiros são exacerbações de funções normais ou anormalidades e distorções e incluem delírios e alucinações, hiperatividade e hostilidade. Os sintomas negativos incluem discurso pobre, isolamento social, perda de vontade e motivação e embotamento emocional. O primeiro grupo tende a ser mais tratável com terapia medicamentosa, enquanto os sintomas negativos aparentemente tardios são mais difíceis de serem tratados, tendendo a persistir, indo em direção a cronicidade e dificultando a reabilitação.

Tabela 2.1.1.1 Critérios diagnósticos para esquizofrenia pelo DSM-IV

A. *Sintomas característicos*: Dois (ou mais) dos seguintes, cada qual presente por uma porção significativa de tempo durante o período de 1 mês (ou menos, se tratados com sucesso):

(1) Delírios

(2) Alucinações

- (3) Discurso desorganizado (por ex., freqüente descarrilhamento ou incoerência)
- (4) Comportamento amplamente desorganizado ou catatônico
- (5) Sintomas negativos, isto é, embotamento afetivo, alogia ou avolição

Nota: Apenas um sintoma do Critério A é necessário se os delírios são bizarros ou as alucinações consistem de vozes que comentam o comportamento ou os pensamentos da pessoa, ou duas ou mais vozes conversando entre si.

B. Disfunção social/ocupacional: Por uma porção significativa de 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 dá-se na infância ou adolescência, fracasso em atingir o nível esperado de aquisição interpessoal, acadêmica ou ocupacional).

C. Duração: Sinais contínuos da perturbação persistem por pelo menos 6 meses. Este período de 6 meses deve incluir pelo menos 1 mês de sintomas (ou menos, se tratados com sucesso) que satisfazem o critério A (isto é, sintomas da fase ativa) e pode incluir períodos de sintomas prodrômicos ou residuais. Durante esses períodos prodrômicos ou residuais, os sinais de perturbação podem ser manifestados apenas por sintomas negativos ou por dois ou mais sintomas relacionados no Critério A presentes de uma forma atenuada (por ex., crenças estranhas, experiências perceptuais incomuns).

D. Exclusão de Transtorno Esquizoafetivo e Transtorno do Humor: O Transtorno Esquizoafetivo e o Transtorno do Humor com aspectos psicóticos foram descartados, porque (1) nenhum Episódio Depressivo Maior, Maníaco ou Misto 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 relativamente à duração dos períodos ativo e residual.

E. *Exclusão de substância/condição médica geral:* A perturbação não se deve aos efeitos fisiológicos diretos de uma substância (por ex., uma droga de abuso, um medicamento) ou a uma condição médica geral.

F. *Relação com um Transtorno Invasivo do Desenvolvimento:* Se existe uma história de Transtorno Autista ou um outro Transtorno Invasivo do Desenvolvimento, o diagnóstico adicional de Esquizofrenia é feito apenas se os delírios ou alucinações proeminentes também estão presentes por pelo menos 1 mês (ou menos, se tratados com sucesso).

Classificação do curso longitudinal (pode ser aplicada apenas 1 mês após o aparecimento inicial dos sintomas da fase ativa):

Episódico Com Sintomas Residuais Entre Episódios (episódios são definidos pelo ressurgimento de sintomas psicóticos proeminentes); especificar também se:

Com Sintomas Negativos Proeminentes

Episódico Sem Sintomas Residuais Entre Episódios

Contínuo (sintomas psicóticos proeminentes estão presentes durante todo o período de observação); especificar também se: **Com Sintomas Negativos**

Proeminentes

Episódio Único em Remissão Parcial; especificar também se: **Com Sintomas Negativos Proeminentes**

Episódio Único em Remissão Completa

Outro Padrão ou Padrão Inespecífico

2.1.2 - Tratamento

No momento não é possível prevenir a esquizofrenia. Desta forma, o foco está no tratamento e na reabilitação do paciente. A farmacoterapia tem provado ser o ponto chave na terapêutica da esquizofrenia. Embora não curativas, as drogas antipsicóticas (i.e. Neurolépticas) se estabeleceram como o tratamento primário para todos os estágios da doença. Possibilitam uma redução no tempo de hospitalização e a possibilidade de manutenção dos pacientes por mais tempo em seus lares. As drogas antipsicóticas clássicas têm sido classificadas como alta, média e baixa potência. Quando usadas em doses aproximadamente equipotentes, todas as classes antipsicóticas parecem ter a mesma eficácia. A escolha da droga é feita, então, levando em consideração quais os efeitos adversos serão menos prejudiciais a determinado paciente. Durante um ataque agudo de esquizofrenia, o objetivo do tratamento é controlar os sintomas psicóticos positivos. Para a maioria dos pacientes que respondem rapidamente aos antipsicóticos a melhora é observada em duas semanas com o incremento ocorrendo em três ou quatro semanas, dependendo da dose. Incremento adicional é visto dentro de alguns meses. É do conhecimento geral que os efeitos terapêuticos dos antipsicóticos são mais pronunciados nos sintomas agudos, positivos do que nos sintomas crônicos, negativos da esquizofrenia. O tratamento de manutenção se refere ao tratamento dos pacientes por longo prazo, visando manter os ganhos obtidos durante o tratamento agudo e a prevenção de possíveis exacerbações da psicose e/ou readmissão hospitalar.

2.2 Radicais livres

Os RL são espécies altamente reativas que possuem um ou mais elétrons desemparelhados no seu orbital externo (Andreazza, 2004). Por esta característica química, reagem indiscriminadamente nos organismos com carboidratos, proteínas, lipídeos e DNA (figura 2.2.1), chamado dano oxidativo. É de interesse particular o dano oxidativo dos lipídeos ou peroxidação lipídica, pelas alterações causadas na membrana celular. Os produtos da peroxidação lipídica ou peróxidos de lipídeos plasmáticos, como o MDA, são medidos pelo TBARS.

Existem diversos mecanismos independentes que podem levar à formação de RL (figura 2.2.2):

- **Toxinas exógenas:** O estilo de vida dos esquizofrênicos é, em geral, pouco saudável. É bem documentado que a maioria destes pacientes são fumantes pesados (Lohr e Flynn, 1992; Leon, 1996) e o aumento dos produtos da peroxidação lipídica foi visto em fumantes (Morrow et al., 1995). Quanto aos aspectos dietéticos, os pacientes com esquizofrenia costumam comer mais do que a população geral (Strassnig et al., 2003). Foi mostrado, em animais, que a restrição calórica reduz o dano celular oxidativo (Sohal et al., 1994) e a oxidação protéica cerebral associada ao envelhecimento (Youngman et al. 1992). O consumo de álcool é bastante elevado entre os esquizofrênicos (Regier et al., 1990; Gerding et al., 1999), sendo que um dos mecanismos da lesão neuronal causada pelo álcool é o dano oxidativo (Hungund e Mahadik, 1993).
- **AODS ineficiente:** Ver página 19 (2.3 Mecanismos antioxidantes).
- **Cálcio intracelular:** As alterações na fluidez de membrana pela peroxidação lipídica podem levar a alterações nos receptores de membrana, aumentando o cálcio intracelular. Este aumento perpetua o dano oxidativo (Figura 2.2.1).

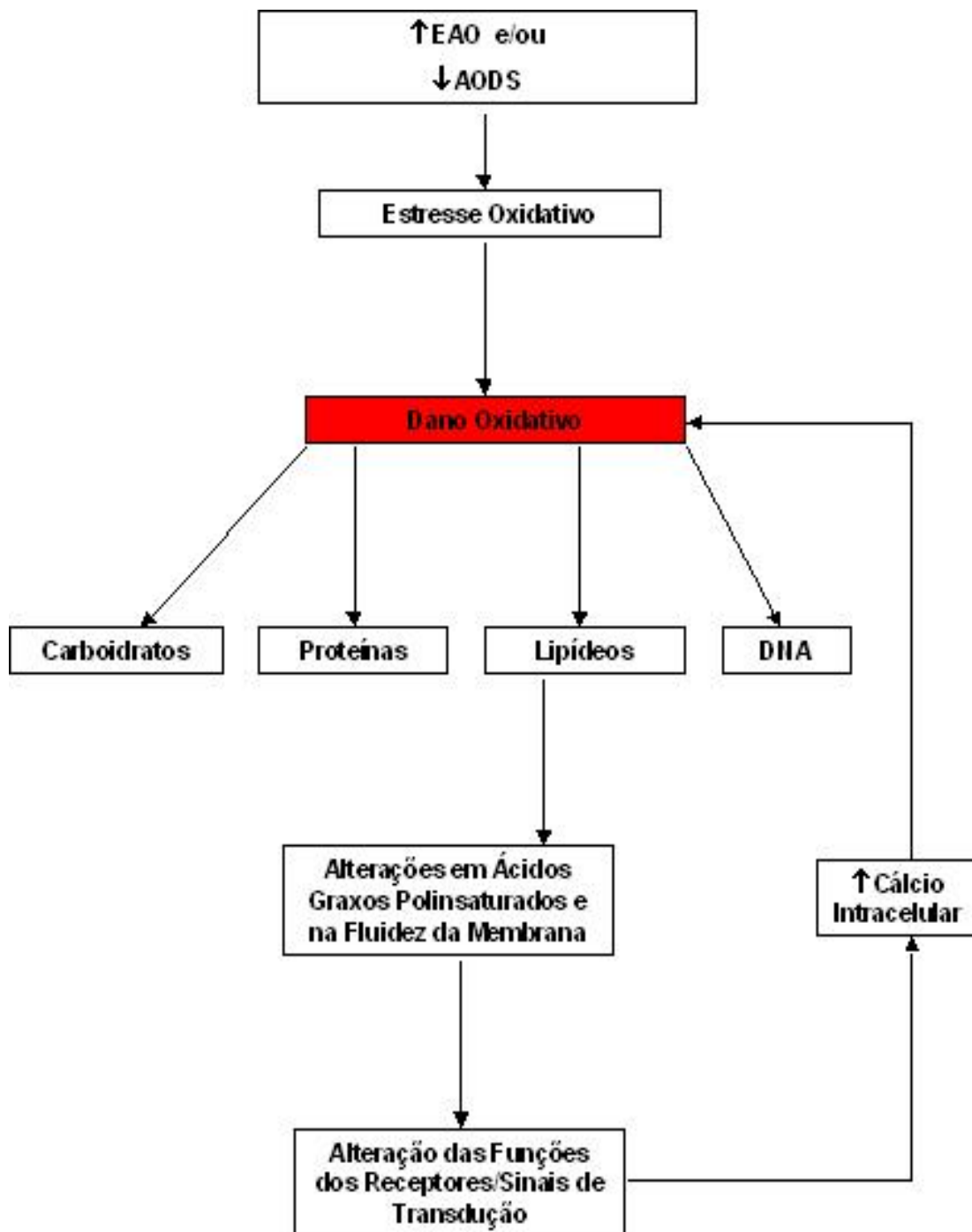


FIGURA 2.2.1 - Principais alterações celulares geradas pelo estresse oxidativo (adaptado de Andrezza et al., 2004 In: Bases Biológicas dos Transtornos Psiquiátricos).

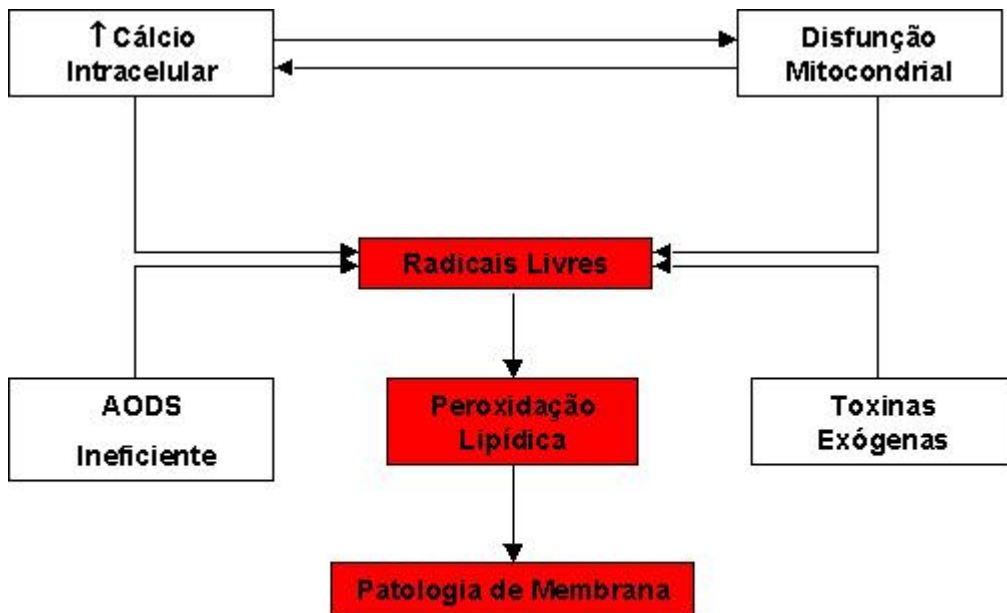


FIGURA 2.2.2 – Esquema demonstrativo de mecanismos patológicos independentes que podem levar a formação de radicais livres e a consequente patologia de membrana (adaptado de Reddy & Yao, 1999 In: Phospholipid Spectrum Disorder in Psychiatry).

- **Disfunção mitocondrial:** As mitocôndrias são responsáveis pelo processamento da maior parte do oxigênio intracelular, com a finalidade de prover energia aos processos metabólicos; também são locais de grande produção de RL. Aproximadamente 3% do oxigênio consumido é convertido em superóxido e posteriormente em peróxido de hidrogênio (Floyd, 1996). No entanto, o AODS, em condições fisiológicas, trata de equilibrar esta produção de RL. As membranas das mitocôndrias, de maneira similar às membranas neuronais, são vulneráveis à peroxidação lipídica (Reddy e Yao, 1999; Mahadik et al., 2001), qualquer problema na fosforilação oxidativa pode levar a diversos problemas celulares,

incluindo diminuição da neurotransmissão, diminuição do reparo no DNA e morte celular.

- **Outros fatores:** Alguns estudos (Lohr 1991; Lohr e Browning, 1995) têm apontado que o metabolismo das catecolaminas, especialmente da dopamina, está associado com a geração de radicais livres e que condições ligadas ao aumento do metabolismo das catecolaminas podem aumentar o aporte dos radicais livres (Zhang et al., 2003a).

2.3 Mecanismos antioxidantes

Os sistemas biológicos possuem estratégias complexas para proteger o organismo contra a toxicidade dos RL através de diversos componentes, enzimáticos e não enzimáticos, denominados AODS.

Os componentes enzimáticos do AODS são, predominantemente, representados pelas enzimas: SOD, CAT e GSH-Px. Estas agem de maneira cooperativa em diferentes fases do metabolismo dos RL, prevenindo os potenciais danos causados por estes. A falha em uma ou mais etapas pode levar a peroxidação lipídica (Figura 2.3.1).

Os componentes não enzimáticos são igualmente importantes na prevenção da peroxidação lipídica. Consistem, principalmente, de moléculas que reagem com as espécies ativas de oxigênio, prevenindo a propagação das reações oxidativas dos RL. O glutatião, o tocoferol (vitamina E), o ácido ascórbico (vitamina C), o β -caroteno, a albumina e o ácido úrico são algumas das moléculas antioxidantes.

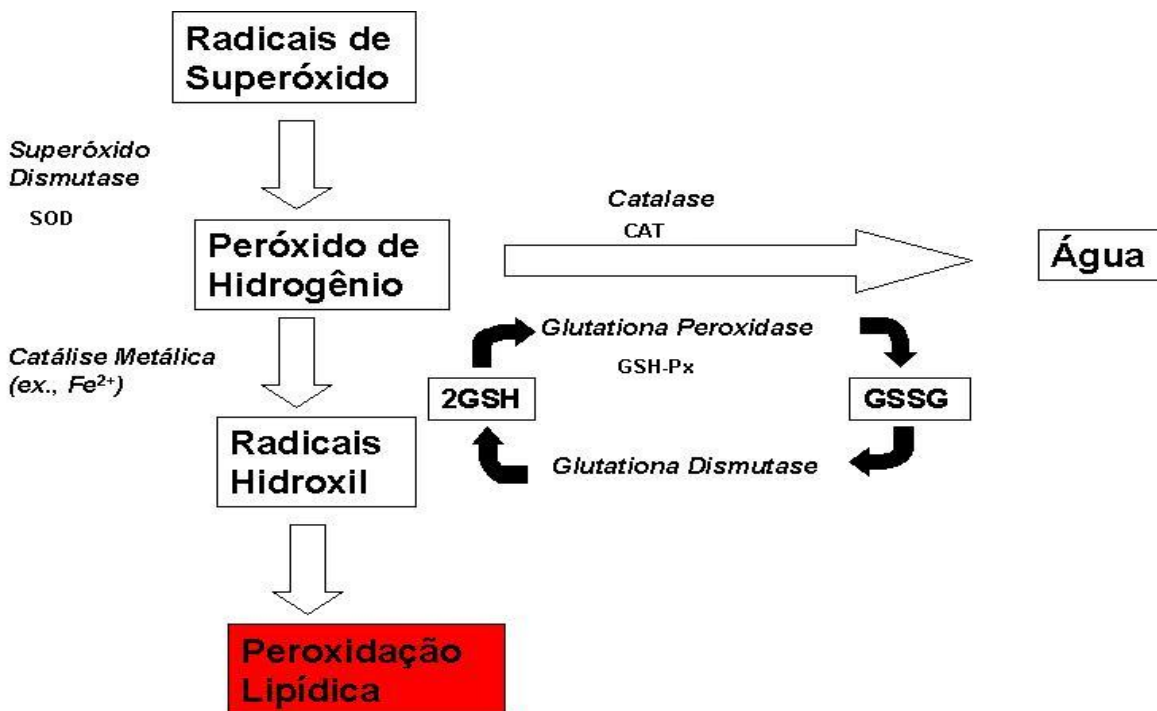


FIGURA 2.3.1 Representação esquemática das enzimas que protegem contra o processo oxidativo na via que leva os radicais de superóxido à peroxidação lipídica (adaptado de Reddy & Yao, 1999 In: Phospholipid Spectrum Disorder in Psychiatry).

2.4 Estresse oxidativo

Em condições normais, as EAO e os RL produzidos numa célula reagem com as defesas enzimáticas e/ou não enzimáticas (Andreazza et al., 2004). O estresse oxidativo acontece quando existe um desequilíbrio entre os processos antioxidantes e pró-oxidantes. Ocorre por consequência do aumento da formação de RL ou pela ineficiência das defesas antioxidantes ou, ainda, pela combinação de ambas. O estresse oxidativo, independente da causa, pode levar a processos patofisiológicos que resultam em toxicidade celular (figura 2.2.1).

Existe uma larga evidência que os radicais livres podem ter um papel importante na patofisiologia da esquizofrenia (Lohr et al., 1995; Mahadik et al., 1996; Reddy et al., 1996; Yao et al., 1998a). Problemas com a defesa antioxidante e aumento da peroxidação lipídica foram relatados previamente em pacientes esquizofrênicos em primeiro episódio, virgens de tratamento (Murkerjee et al., 1996; Mahadik et al., 1998; Khan et al., 2002; Arvindakshan et al., 2003; Reddy et al., 2003) e naqueles cronicamente medicados com neurolépticos típicos (McCreadie et al., 1995; Herken et al., 2001; Khan et al., 2002).

Vários peróxidos de lipídeos plasmáticos, como o MDA, medido pelo TBARS, foram estudados recentemente em esquizofrenia e encontrado evidências de níveis aumentados de produtos de peroxidação lipídica plasmática em pacientes sem uso de medicação (Arvindakshan et al., 2003; Mahadik et al., 1998; Petronijevic et al., 2003, Srivastava, 2001) e em uso de medicação (Akyol et al., 2002; Arvindakshan et al., 2003; Khan et al., 2002; Petronijevic et al., 2003). Nestes estudos a maioria dos pacientes esquizofrênicos estava usando neurolépticos típicos.

Cadet e Lohr (1987) sugeriram que o dano oxidativo encontrado em esquizofrênicos poderia ser devido ao uso de neurolépticos. Entretanto, diversos estudos (Murkerjee et al., 1996; Mahadik et al., 1998; Khan et al., 2002; Arvindakshan et al., 2003; Reddy et al., 2003) evidenciaram desequilíbrio e dano oxidativo em pacientes esquizofrênicos virgens de tratamento.

Muito do enfoque no mecanismo de defesa antioxidante está nas enzimas antioxidantes principais: SOD, CAT e GSH-Px. Destas, a atividade da SOD tem sido mais freqüentemente estudada.

Foi, recentemente, relatado níveis elevados de SOD correlacionados positivamente com sintomas positivos, em esquizofrênicos sem neurolépticos (Zhang et al., 2003a), correlação positiva dos níveis de GSH-Px com a pontuação em escala para

sintomas psicóticos (Yao et al., 1999) e um aumento de SOD em esquizofrenia do tipo residual comparada aos tipos desorganizado e paranóide (Herken et al., 2001).

Redução de níveis séricos de SOD depois do tratamento com risperidona (Zhang et al., 2003b) e aumento das atividades de SOD e de GSH-Px em pré-tratamento com haloperidol quando comparado com o período de tratamento com a droga (Yao et al., 1998b) foram vistas.

Parikh et al. (2003) evidenciou aumento da peroxidação lipídica e atividade diminuída de SOD no cérebro de ratos tratados cronicamente com haloperidol. Não houve nenhuma alteração nos níveis das enzimas antioxidantes e dos produtos peroxidação lipídica no cérebro de ratos tratados cronicamente com risperidona, olanzapina ou clozapina. Entretanto é sugerido que a clozapina possa agir como um RL (Fisher, 1991).

2.5 Estresse oxidativo e neuropatologia

A hipótese neurodesenvolvimental para explicar a fisiopatologia da esquizofrenia tem sido crescentemente considerada (Weinberger, 1995), não só por causa de achados anatomopatológicos que a apóiam, mas também pela falta de sinais de neurodegeneração (Dwark, 1997; Heckers, 1997; Arnold et al., 1998) e gliose reativa (Casanova et al., 1990) em estudos de neuropatologia. Porém, uma vez que a esquizofrenia provavelmente envolve uma etiologia multifatorial, a dicotomia neurodesenvolvimento/neurodegeneração pode não ser apropriada. Além disso, como assinalado por Lieberman (1999), vários achados de neuroimagem e de necrópsia, junto com a deterioração comportamental e cognitiva observada em pacientes esquizofrênicos, podem refletir um processo neurodegenerativo.

Alguns estudos em pacientes esquizofrênicos, com a proteína glial S100B, foram feitos recentemente e encontrado níveis séricos elevados desta proteína (Wiesmann et al., 1999; Lara et al., 2001; Rothermundt, 2001). Estes achados despertaram especulações sobre uma possível hipótese neurodegenerativa para a fisiopatologia da esquizofrenia. A S100B é uma proteína produzida e liberada pelos astrócitos (Donato, 1999), possui ação trófica em neurônios e astrócitos (Marshak, 1990); portanto, tem um papel no desenvolvimento e manutenção do sistema nervoso. Níveis aumentados de S100B no líquido céfalo-raquidiano ou no soro têm sido usados como um marcador sensível de lesão cerebral (Ingebrigtsen et al., 1999) e podem indicar ativação ou morte de astrócitos, além de disfunção na barreira hemato-encefálica (Lara et al., 2001).

Levando em consideração os achados com os estudos da proteína S100B em esquizofrenia, Moises et al. (2002) sugeriu que uma possível desestabilização sináptica, decorrente da gliose encontrada nesta população, poderia provocar os achados comportamentais em pacientes esquizofrênicos.

O estudo do metabolismo de fosfolipídeos em esquizofrênicos tem gerado vários resultados interessantes. Os fosfolipídeos são componentes fundamentais das membranas celulares, que regulam funções básicas das células. No SNC, funções como liberação e captação de neurotransmissores, atividade de canais iônicos e produção de segundos mensageiros são regulados por fosfolipídeos de membrana (Horrobin et al., 1994; Horrobin, 1998). As moléculas de fosfolipídeos são uma das provas da interação dos gens com o ambiente. Estas moléculas são compostas de ácidos graxos, os quais vêm da alimentação, e são metabolizados, sintetizados, remodelados e degradados por enzimas, que são geneticamente determinadas (Horrobin, 1998). A principal representante destas enzimas é a PLA2, cujo aumento de atividade foi identificado em pacientes esquizofrênicos (Gattaz et al. 1987; Gattaz et al. 1990; Gattaz et al. 1995). O aumento da PLA2 se correlaciona positivamente com o aumento da TBARS (Scheffer et al., 1999)

e, é sugerido que nos esquizofrênicos a peroxidação lipídica seja seguida por aumento desta enzima (Van den Berg et al., 1993; Smalheiser e Swanson, 1998). Sugerem também que a peroxidação lipídica teria um papel principal nas alterações de membrana dos indivíduos com esquizofrenia e que a PLA2 desempenharia um papel secundário na causa destas alterações (Mahadik et al. 1999a e 1999b).

Existem evidências de patologia de membrana e de estresse oxidativo no cérebro. Foi fortemente sugerida (Reddy and Yao, 1996) uma associação entre as anomalias de membrana, o estresse oxidativo e os distúrbios comportamentais vistos na esquizofrenia. Da mesma forma, Ribeiro et al. (comunicação pessoal) encontrou, em pacientes com encefalopatia hepática, aumento dos níveis séricos de S100B fortemente correlacionado ao aumento dos níveis séricos de TBARS; sugerindo que o estresse oxidativo parece ter um papel causal na disfunção glial. A interação dos diversos mecanismos que podem ser provocados pelo estresse oxidativo e levar a alterações no comportamento é exposta na figura 2.5.1.

O dano oxidativo celular em indivíduos com esquizofrenia, resultante do estresse oxidativo, pode afetar o cérebro estruturalmente e funcionalmente (Mahadik et al., 2001). A alteração do sinal de transdução para os diversos neurotransmissores nos receptores de membrana fosfolípídeo-dependentes e o comprometimento glial, medido pelo aumento dos níveis da proteína S100B, podem ser indicadores deste dano tanto na estrutura quanto na função do cérebro.

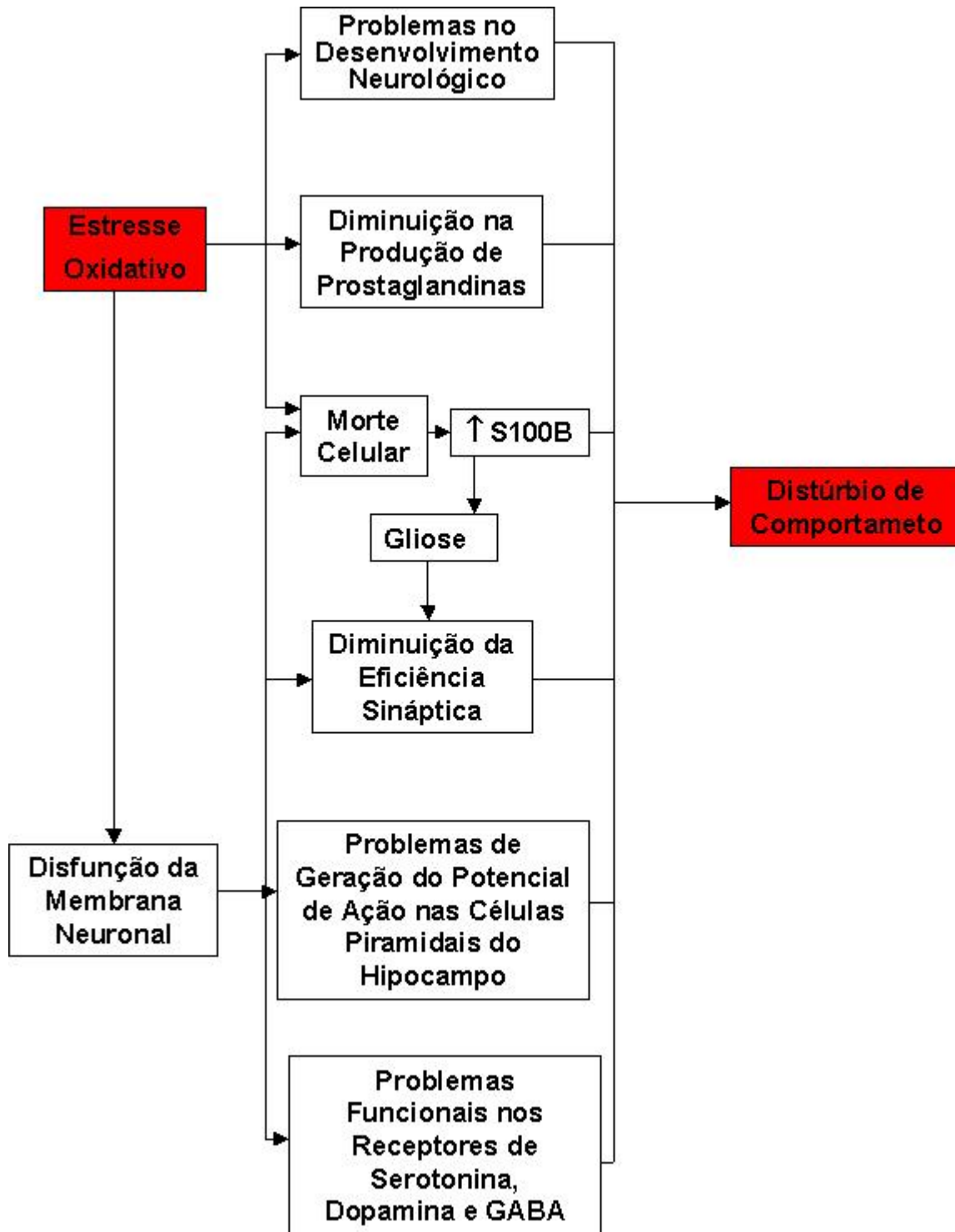


FIGURA 2.5.1 - Esquema demonstrativo de mecanismos provocados pelo estresse oxidativo que podem mediar o dano neuronal, levando a distúrbios de comportamento (adaptado de Reddy & Yao, 1999 In: Phospholipid Spectrum Disorder in Psychiatry).

3 – OBJETIVOS

3.1 - Objetivo Geral

O objetivo deste estudo é verificar se pacientes com diagnóstico de esquizofrenia pelos critérios da DSM-IV apresentam alteração nos níveis séricos de SOD e TBARS quando comparados com um grupo controle de voluntários saudáveis.

3.2 - Objetivos específicos

- Determinar os níveis séricos de SOD e TBARS em pacientes esquizofrênicos e em controles saudáveis.
- Determinar os níveis séricos de SOD e TBARS em pacientes esquizofrênicos em uso de haloperidol e de clozapina.
- Determinar os níveis séricos de SOD e TBARS em homens e mulheres com diagnóstico de esquizofrenia.
- Correlacionar os níveis séricos de SOD e TBARS com a idade no diagnóstico de esquizofrenia.
- Correlacionar os níveis séricos de SOD e TBARS em pacientes esquizofrênicos com o tempo de doença.
- Determinar os níveis séricos de SOD e TBARS de acordo com o curso da doença em pacientes esquizofrênicos.
- Correlacionar os níveis séricos de SOD e TBARS com os escores na BPRS (Thompson et al., 1994) em pacientes esquizofrênicos.
- Determinar os níveis séricos de SOD e TBARS de acordo com o subtipo de esquizofrenia apresentado pelos pacientes esquizofrênicos.

4 – REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA

- AKYOL O, HERKEN H, UZ E, FADILLIOGLU E, UNAL S, SOGUT S, OZYURT H, SAVAS HA. The indices of endogenous oxidative and antioxidative processes in plasma from schizophrenic patients. The possible role of oxidant/antioxidant imbalance. *Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry* 26(5): 995-1005, 2002.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, fourth Edition. Washington, DC, 1994.
- ANDREAZZA AC, SOARES DG, KEHL LF, BORELLA MLL, SALVADOR M. Transtornos neuropsiquiátricos estresse oxidativo. In: *Bases Biológicas dos Transtornos Psiquiátricos*, KAPCZINSKI F, QUEVEDO J, IZQUIERDO I. 2ª ED., Artmed, Porto Alegre, 2004.
- ARNOLD SE, TROJANOWSKI JQ, GUR RE, BLACKWELL P, HAN LY, CHOI C. Absence of neurodegenerative and neural injury in the cerebral cortex in a sample of elderly patients with schizophrenia. *Archives of General Psychiatry* 55: 225-232, 1998.
- ARVINDAKSHAN M, SITASAWAD S, DEBSIKDAR V, GHATE M, EVANS D, HORROBIN DF, BENNETT C, RANJEKAR PK, MAHADIK SP. Essential polyunsaturated fatty acid and lipid peroxide levels in never-medicated and medicated schizophrenia patients. *Biological Psychiatry* 53(1): 56-64, 2003.
- AZEVEDO MH, SOARES MJ, COELHO I, DOURADO A, VALENTE J, MACEDO A, PATO M, PATO C. Using consensus OPCRIT diagnoses. An efficient procedure for best-estimate lifetime diagnoses. *British Journal of Psychiatry* 175: 154-7, 1999.
- CADET JL, LOHR JB. Free radical and the developmental pathophysiology of schizophrenic burnout. *Integr Psychiatry* 5: 40-48, 1987.
- CASANOVA MF, STEVENS JR, KLEIMAN JE. Astrocytosis in the molecular layer of dentate gyrus: a study in Alzheimer's disease and schizophrenia. *Psychiatry Research Neuroimaging* 35: 149-166, 1990.
- CRADDOCK M, ASHERSON P, OWEN MJ, WILLIAMS J, MCGUFFIN P, FARMER AE. Concurrent validity of the OPCRIT diagnostic system. Comparison of OPCRIT diagnoses with consensus best-estimate lifetime diagnoses. *British Journal of Psychiatry* 169(1): 58-63, 1996.
- DONATO R. Functional roles of S100 proteins, calcium-binding proteins of the EF-hand type. *Biochimica et Biophysica Acta* 1450:191-231, 1999.
- DWARD AJ. Postmortem studies of the hippocampal formation in schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin* 23: 385-402, 1997.
- FISHER AB. Possible role of free radical formation in clozapine (clozaril)-induced agranulocytosis. *Mol. Pharmacol.* 40: 846-853, 1991.
- FLOYD RA. Mitochondrial damage in neurodegenerative disease. In: *Free radicals in brain physiology and disorders*, PACKER L, HIRAMATSU M, YOSHIKAWA T. Academic Press,

Berlin, 1996.

GATTAZ WF, KOLLISCH M, THURN T, VIRTANEN JA, KINNUNEN PKJ. Increased plasma phospholipase-A2 activity in schizophrenic patients: reduction after neuroleptic therapy. *Biological Psychiatry* 22: 421-6, 1987.

GATTAZ WF, HUBNER CVK, NEVALAINEN TJ. Increased serum phospholipase A2 activity in schizophrenia: a replication study. *Biological Psychiatry* 28: 495-501, 1990.

GATTAZ WF, SCHMITT A, MARAS A. Increased platelet phospholipase A2 activity in schizophrenia. *Schizophrenia Research* 16: 1-6, 1995.

GERDING LB, LABBATE LA, MEASON MO, SANTOS AB, ARANO G. Alcohol dependence and hospitalization in schizophrenia. *Schizophrenia Research* 38: 71-75, 1999.

HECKERS S. Neuropathology of schizophrenia: cortex, thalamus, basal ganglia, and neurotransmitter-specific projection system. *Schizophrenia Bulletin* 23: 403-421, 1997.

HERKEN H, UZ E, OZYURT H, SOGUT S, VIRIT, O, AKYOL O. Evidence that the activities of erythrocyte free radical scavenging enzymes and the products of lipid peroxidation are increased in different forms of schizophrenia. *Molecular Psychiatry* 2001; 6(1): 66-73.

HORROBIN DF, GLEN AI, VADDADI K. The membrane hypothesis of schizophrenia. *Schizophrenia Research* 13: 195-207, 1994.

HORROBIN DF. The membrane phospholipid hypothesis as a biochemical basis for the neurodevelopmental concept of schizophrenia. *Schizophrenia Research* 30: 193-208, 1998.

HUNGUND BL, MAHADIK SP. Role of gangliosides in behavioral and biochemical actions of alcohol: Cell membrane structure and function. *Alcoholism: Clinical and experimental research* 17: 329-339, 1993.

INGEBRIGTSEN T, WATERLOO K, JACOBSEN EA, LANGBAKK B, ROMNER B. Traumatic brain damage in minor head injury: relation of serum S-100 protein measurements to magnetic resonance imaging and neurobehavioral outcome. *Neurosurgery* 45: 468-475, 1999.

KHAN MM, EVANS DR, GUNNA V, SCHEFFER RE, PARIKH VV, MAHADIK SP. Reduced erythrocyte membrane essential fatty acids and increased lipid peroxides in schizophrenia at the never-medicated first-episode of psychosis and after years of treatment with antipsychotics. *Schizophrenia Research* 58(1): 1-10, 2001.

LARA DR, GAMA CS, BELMONTE-DE-ABREU P, PORTELA LV, GONÇALVES CA, FONSECA M, HAUCK S, SOUZA DO. Increased serum S100B protein in schizophrenia: a study in medication-free patients. *Journal of Psychiatric Research* 35(1):11-4, 2001.

LEON JD. Smoking and vulnerability for schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin* 22: 405-409, 1996.

LIEBERMAN, J.A. Pathophysiologic mechanisms in the pathogenesis and clinical course of schizophrenia. *Journal of Clinical Psychiatry* 60: S9-S12, 1999.

LOHR JB. Oxygen radicals and neuropsychiatric illness. Some speculations. *Archives of General Psychiatry* 48: 1097-1106, 1991.

LOHR JB, FLYNN K. Smoking and schizophrenia. *Schizophrenia Research* 8: 9-102, 1992.

- LOHR JB, BROWNING JA. Free radical involvement in neuropsychiatry illnesses. *Psychopharmacol Bull* 31 (1): 159-65, 1995.
- MAHADIK SP, MUKHERJEE S. Free radical pathology and antioxidant defense in schizophrenia: a review. *Schizophrenia Research* 19(1): 1-17, 1996.
- MAHADIK SP, MUKHERJEE S, SCHEFFER R, CORRENTI EE, MAHADIK JS. Elevated plasma lipid peroxides at the onset of nonaffective psychosis. *Biological Psychiatry* 43(9): 674-9, 1998.
- MAHADIK SP, MULCHANDANI M, HEGDE MV, RANJEKAR PK. Cultural and socioeconomic differences in dietary intake of essential fatty acids and antioxidants: Effects on the outcome. In: *Phospholipid Spectrum Disorder in Psychiatry*, PEET M, GLEN I, HORROBIN DF, Marius press, 1999a.
- MAHADIK SP, SITASAWAD V, MULCHANDANI M. Membrane peroxidation and neuropathology of schizophrenia. In: *Phospholipid Spectrum Disorder in Psychiatry*, PEET M, GLEN I, HORROBIN DF, Marius press, 1999b.
- MAHADIK SP, EVANS D, LAL H. Oxidative stress and role of antioxidant and ω -3 essential fatty acid supplementation in schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psych* 25: 463-493, 2001.
- MARSHAK DR. S100 beta as a neurotrophic factor. *Prog Brain Res* 86: 169-181, 1990.
- MCCREADIE RG, MACDONALD E, WILES D, CAMPBELL G, PATERSON JR. The Nithsdale Schizophrenia Surveys. XIV: Plasma lipid peroxide and serum vitamin E levels in patients with and without tardive dyskinesia, and in normal subjects. *British Journal of Psychiatry* 167(5): 610-7, 1995.
- McGUFFIN P, FARMER A, HARVEY I. A polydiagnostic application of operational criteria in studies of psychotic illness. Development and reliability of the OPCRIT system. *Archives of General Psychiatry* 48(8), 764-70, 1991.
- MOISES HW, ZOEGA T, GOTTESMAN LL. The glial growth factors deficiency and synaptic destabilization hypothesis of schizophrenia. *BMC Psychiatry* 2:8, 2002.
- MORROW JD, FREI B, LONGMIRE AW, GAZIANO JM, LYNCH SN, SHYR Y, STRAUSS WE, OATES JA, ROBERTS LJ. Increase in circulating products of lipid peroxidation (F2-isoprostanes) in smokers: smoking as a cause of oxidative damage. *New England Journal of Medicine* 332: 1198-1203, 1995.
- MUKHERJEE S, MAHADIK SP, SCHEFFER R, CORRENTI EE, KELKAR H. Impaired antioxidant defense at the onset of psychosis. *Schizophrenia Research* 19(1):19-26, 1996.
- NURNBERGER JR. JR, BLEHAR MC, KAUFMANN CA, YORK-COOLER C, SIMPSON SG, HARKAVY-FRIEDMAN J, SEVERE JB, MALASPINA D, REICH T. Diagnostic interview for genetic studies. Rationale, unique features, and training. NIMH Genetics Initiative. *Archives of General Psychiatry* 51(11), 849-59, 1994.
- PARIKH V, KHAN MM, MAHADIK SP. Differential effects of antipsychotics on expression of antioxidant enzymes and membrane lipid peroxidation in rat brain. *Journal of Psychiatric Research* 37: 43-51, 2003.

- PETRONIJEVIC ND, MICIC DV, DURICIC B, MARINKOVIC D, PAUNOVIC VR. Substrate kinetics of erythrocyte membrane Na,K-ATPase and lipid peroxides in schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biological Psychiatry* 27(3): 431-40, 2003.
- RAN M, XIANG M, HUANG M, SHAN Y. Natural course of schizophrenia: 2-year follow-up study in a rural Chinese community. *British Journal of Psychiatry* 178: 154-158, 2001.
- REDDY RD, YAO JK. Free radical pathology in schizophrenia: a review. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 55(1-2): 33-43, 1996.
- REDDY R, YAO JK. Membrane-protective strategies in schizophrenia: Conceptual and treatment issues. In: *Phospholipid Spectrum Disorder in Psychiatry*, PEET M, GLEN I, HORROBIN DF, Marius press, 1999.
- REDDY R, KESHAVAN M, YAO JK. Reduced plasma antioxidants in first-episode patients with schizophrenia. *Schizophrenia Research* 62(3): 205-12, 2003.
- REGIER DA, FARMER ME, RAE DS, LOCKE BZ, KEITH SJ, JUDD LL, GOODWIN FK. Comorbidity of mental disorders with alcohol and other drug abuse. *J Am Med Assoc* 264: 2511-2518, 1990.
- ROTHERMUNDT M, MISSLER U, AROLT V, PETERS M, LEADBEATER J, WIESMANN M, RUDOLF S, WANDINGER KP, KIRCHNER H. Increased S100B blood levels in unmedicated and treated schizophrenic patients are correlated with negative symptomatology. *Molecular Psychiatry* 6:445-449, 2001.
- SCHEFFER RD, BRADLEY J, MAHADIK SP. Elevated lipid peroxidation and phospholipase A2: Possible mechanism of the lower cell membrane essential polyunsaturated fatty acids in schizophrenia. *Biological Psychiatry* 43:101, 1999.
- SMALHEISER NR, SWANSON DR. Calcium-dependent phospholipase A2 and schizophrenia. Letter to the Editor. *Archives of General Psychiatry* 55: 752-753, 1998.
- SOHAL RS, KU HH, AGARWAL S, FORSTER MJ, LAL H. Oxidative damage, mitochondrial oxidant generation and antioxidant defenses during aging, and in response to food restriction in mouse. *Mech. Aging Dev.* 74: 121-133, 1994.
- SRIVASTAVA N, BARTHWAL MK, DALAL PK, AGARWAL AK, NAG D, SRIMAL RC, SETH PK, DIKSHIT M. Nitrite content and antioxidant enzyme levels in the blood of schizophrenia patients. *Psychopharmacology* 158(2): 140-5, 2001.
- STRASSNIG M, BRAR JS, GANGULI R. Nutritional assessment of patients with schizophrenia: a preliminary study. *Schizophrenia Bulletin* 29(2):393-7, 2003.
- THOMPSON PA, BUCKLEY PF, MELTZER HY. The brief psychiatric rating scale: effect of scaling system on clinical response assessment. *J Clin Psychopharmacol* 14:344-6, 1994.
- VAN DE BERG JJM, OP DEN KAMP JAF, LUBIN BH, KUYPERS FA. Conformational changes in oxidized phospholipids and their preferential hydrolysis by phospholipase A2: A monolayer study. *Biochemistry* 32: 4962-4967, 1993.
- WEINBERGER, DR. From neuropathology to neurodevelopment. *Lancet*, 346: 552-557, 1995.
- WIESMANN M, WANDINGER KP, MISSLER U, ECKHOFF D, ROTHERMUNDT M, AROLT V, KIRCHNER H. Elevated plasma levels of S-100b protein in schizophrenic patients. *Biological Psychiatry* 45: 1508-1511, 1999.

- YAO JK, REDDY R, MCELHINNY LG, VAN KAMMEN DP.
Reduced status of plasma total antioxidant capacity in schizophrenia. *Schizophrenia Research* 32(1): 1-8, 1998a.
- YAO JK, REDDY R, MCELHINNY LG, VAN KAMMEN DP.
Effects of haloperidol on antioxidant defense system enzymes in schizophrenia. *Journal of Psychiatric Research* 32(6): 385-91, 1998b.
- YAO JK, REDDY RD, VAN KAMMEN DP. Human plasma glutathione peroxidase and symptom severity in schizophrenia. *Biological Psychiatry* 45 (11): 1512-5, 1999.
- YOUNGMAN LD, PARK JYK, AMES BN. Protein oxidation associated with aging is reduced by dietary restriction of protein or calories. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 9112-9116, 1992.
- ZHANG XY, ZHOU DF, CAO LY, ZHANG PY, WU GY.
Elevated blood superoxide dismutase in neuroleptic-free schizophrenia: association with positive symptoms. *Psychiatry Research* 117(1): 85-8, 2003a.
- ZHANG XY, ZHOU DF, CAO LY, ZHANG PY, WU GY, SHEN YC.
The effect of risperidone treatment on superoxide dismutase in schizophrenia. *J Clin Psychopharmacol* 23(2): 128-31, 2003b.

5 – ARTIGO CIENTÍFICO EM INGLÊS (ESTUDO 1)

Elevated serum superoxide dismutase and thiobarbituric acid reactive substances in chronically medicated schizophrenic patients

Clarissa Severino Gama ^{1, *}, Mirian Salvador ², Ana Cristina Andreazza ², Flavio Kapczinski ¹, Paulo Silva Belmonte-de-Abreu ¹

1 Department of Psychiatry, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Ramiro Barcelos, 2350, Porto Alegre, RS, 90035-003, Brazil

2 Biotechnology Institute, University of Caxias do Sul, Rua Francisco Getulio Vargas 1130, Caxias do Sul, RS, 95070-560, Brazil

***Corresponding Author**

Clarissa Severino Gama
Rua Passo da Pátria, 579/301
Porto Alegre – RS – Brazil
90460-060
E-mail: csgama@yahoo.com

Abstract

Background: Impaired antioxidant defense and increased lipid peroxidation has been reported in drug naïve, first episode and chronically medicated schizophrenic patients.

Methods: We examined serum superoxide dismutases (SOD) and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in two groups of chronic medicated DSM-IV schizophrenic patients, under haloperidol or clozapine and a group of healthy controls. Each subject had 5 ml blood samples collected by venipuncture.

Results: Serum SOD and TBARS were significantly higher ($p=0.001$) in patients than in controls. Among patients, serum TBARS was higher ($p=0.008$) in those taking clozapine, but no difference was found for SOD levels ($p=0.710$).

Conclusions: Conditions associated with increased catecholamines metabolism, particularly dopamine, may increase the radical burden. It is reasonable to argue that the difference found in TBARS levels among patients might be due to the course of disease, instead of medication. Further investigation of relationship between oxidative imbalance and the course of schizophrenia is warranted.

Key words: Schizophrenia, Antioxidant Enzymes, Peroxidative Damage, Oxidative Imbalance, Clozapine, Haloperidol

Introduction

There is great evidence in recent years that oxygen free radicals may play an important role in the pathophysiology of schizophrenia (Lohr and Browning, 1995; Mahadik and Murkherjee, 1996; Reddy and Yao, 1996; Yao et al., 1998a). Impaired antioxidant defense and increased lipid peroxidation has been reported in chronic medicated (McCreadie et al., 1995; Herken et al., 2001; Khan et al., 2002) and in drug naïve first episode schizophrenic patients (Murkerjee et al., 1996; Mahadik et al., 1998; Arvindakshan et al., 2003; Reddy et al., 2003).

Several plasma lipid peroxides, like Malondialdehyde (MDA), measured by the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), have been recently studied in schizophrenia, providing some evidence of increased levels of lipid peroxidation products in plasma of drug free (Mahadik et al., 1998; Arvindakshan et al., 2003; Petronijevic et al., 2003; Srivastava et al., 2001) and medicated (Khan et al., 2002; Petronijevic et al., 2003; Akyol et al., 2002) schizophrenic patients, most of them under typical neuroleptics regimens.

Much of the focus in antioxidant defense mechanism has been on the key scavenging antioxidant enzymes: superoxide dismutases (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GSH-Px). Of these, SOD activity has been the most frequently examined. It had been recently reported, elevated blood SOD levels associated with positive symptoms in neuroleptic-free schizophrenics (Zhang et al., 2003a), a significant reduction of SOD levels after risperidone treatment (Zhang et al., 2003b) and higher SOD and GSH-Px activities in pretreatment drug free-condition compared to haloperidol treatment condition (Yao et al., 1998b).

Parikh et al. (2003) evidenced an increase of lipid peroxidation and decreased SOD activity in rats' brain chronically treated with haloperidol. There were no alterations in levels of antioxidant enzymes and in lipid peroxidation products in rats' brain chronically treated with risperidone, olanzapine or clozapine.

Given the evidence in literature of increased oxidative stress in schizophrenia, we measured serum SOD and TBARS in two groups of chronically medicated patients, under haloperidol or clozapine and a group of healthy controls.

Material and Methods

Subjects

Seventeen schizophrenic outpatients (12 male and 5 female), mean age 35 (\pm 10 years), mean illness duration 15 (\pm 7 years) and 15 healthy controls (11 male and 4 female), mean age 34 (\pm 10 years) were enrolled in this study protocol, which was approved by the Ethical Committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre. All subjects were non-smokers. Patients had to fulfill DSM-IV (McGuffin et al., 1991; Craddock et al., 1996; Azevedo et al., 1999) criteria for schizophrenia. Healthy control subjects had major psychiatric disorders excluded based on history taking and chart review. Patients were recruited from the Schizophrenia Program of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), RS and controls were mostly from the hospital staff. All subjects were advised about the procedure and signed the informed consent to participate in the study. Ten patients were taking haloperidol and seven patients were under clozapine, none of them had tardive dyskinesia. Each subject had 5 ml blood samples collected by venipuncture without anticoagulants and serum was obtained by centrifugation at 3,000xg for 5 minutes and kept frozen at -70°C for up to 6 months, until the assay.

Determination Superoxide dismutases activity

Superoxide dismutases activity was determined spectrophotometrically in plasma samples by measuring the inhibition of the rate of autocatalytic adrenochrome formation at 480nm in a reaction medium containing 1mmol/l adrenaline (pH 2) and 50 mmol/l glycine (pH 10,2). This reaction was conducted in constant temperature 30°C during 3 minutes. The enzymic activity is expressed as superoxide dismutase units per g of protein. One unit is

defined as the amount of enzyme that inhibits the rate of adrenochrome formation in 50% (Mirsa et al., 1972).

Determination of plasma MDA levels

Levels of plasma MDA were measured by the TBARS method, described by Wills (1966). Peroxidation was measured as the production of MDA which in combination with TBARS forms a pink chromogen i.e. compound whose absorbance at 530 nm was measured. MDA results were expressed as nmol/ml.

Statistical Analysis

Analysis was performed by Statistical Product and Service Solutions 10.0 Version (SPSS). Between-group comparisons were made by Student's t-test. Relationships between variables were assessed with Pearson's product-moment correlation coefficient. Data were presented as mean \pm S.D.

Results

Mean serum SOD (Table 1) and mean serum TBARS (Table 2) concentrations were significantly higher in schizophrenic patients than in controls. Among patients there were no significant difference in SOD levels between the group taking clozapine and the group taking haloperidol (Table 3), but mean serum TBARS was significantly higher in those taking clozapine than in those under haloperidol (Table 4). Serum SOD remained significantly higher in schizophrenic patients when haloperidol and clozapine groups were compared separately to control group ($p=0.011$ and 0.001), the same difference was observed with serum TBARS levels when haloperidol and clozapine groups were compared separately to controls subjects ($p=0.005$ and 0.0001).

Additionally, serum SOD and TBARS levels failed to show correlation with illness duration ($r = 0.126$, $p = 0.630$ for SOD and $r = - 0.101$, $p = 0.676$ for TBARS).

Discussion

The present findings provide additional evidence of increased oxidative stress in schizophrenia. We found elevated serum SOD activity levels and elevated serum TBARS levels in chronically medicated schizophrenic patients compared to controls; and elevated serum TBARS levels, but not SOD activity levels, in patients taking clozapine compared with those taking haloperidol. We also found no correlation of SOD and TBARS levels with illness duration.

The finding of elevated serum SOD activity levels in schizophrenia is in line with other previous reports (Zhang et al., 2003a; Melamed et al., 1998). This had already been postulated as a response to the increased oxidative tone in this disease (Lohr and Browning, 1995) and suggests a process of oxidative stress in schizophrenia. The increased of TBARS levels is also in agreement with literature (Khan et al., 2002; Arvindakshan et al., 2003; Petronijevic et al., 2003; Akyol et al., 2002), reinforcing the idea of some oxidative damage in this disease and a possible oxidant/antioxidant imbalance.

Parikh et al. (2003) found in rats' brain an increase of lipid peroxidation in those animals chronically treated with haloperidol, but not in animals chronically treated with risperidone, olanzapine or clozapine. We found increased levels of a serum marker of lipid peroxidation (TBARS) in schizophrenic patients chronically treated with clozapine compared to patients treated with haloperidol, contrasting to Parikh results. Anyway, these contrasting results might be due to differences in species in each study (rats and humans), different tissues (brain and serum) and the absence of schizophrenia in Parikh study.

Some studies (Lohr and Browning, 1995; Lohr, 1991) have pointed out that metabolism of catecholamine, particularly dopamine, is associated with free radical generation and that conditions associated with increased catecholamines metabolism may increase the radical burden (Zhang et al., 2003a). This may explain the high SOD and TBARS levels among schizophrenic patients. However, the increased lipid peroxidation found in this study, expressed by elevated TBARS levels, in the group taking clozapine may reveal an indicative of illness severity in this group. Since this drug is formally indicated to a specific group of schizophrenic patients whose symptoms are refractory to the others neuroleptics (Kane et al., 1988), clozapine may not be the real cause of increased lipid peroxidation, instead of this, it could be an indicative of illness severity.

In fact, for a cause-effect relationship, clinical trials are needed to reach precise conclusions. On the other hand, the findings of this study give compelling evidence for the need of further investigation of relationship between scavenging antioxidants enzymes and lipid peroxidation with schizophrenia subtypes and different outcome patterns in this illness.

Acknowledgements: This study was supported by grants from CAPES-CRICES (Brazil-Portugal International Cooperative Study #078/01), FAPERGS (#0104804) and FIPE-HCPA (#02396).

References

1. Akyol O, Herken H, Uz E, Fadillioglu E, Unal S, Sogut S, Ozyurt H, Savas HÁ (2002): The indices of endogenous oxidative and antioxidative processes in plasma from schizophrenic patients. The possible role of oxidant/antioxidant imbalance. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psych* 26(5): 995-1005.
2. Arvindakshan M, Sitasawad S, Debsikdar V, Ghate M, Evans D, Horrobin DF, Bennett C, Ranjekar PK, Mahadik SP (2003): Essential polyunsaturated fatty acid and lipid peroxide levels in never-medicated and medicated schizophrenia patients. *Biol Psychiatry* 53(1): 56-64.
3. Azevedo MH, Soares MJ, Coelho I, Dourado A, Valente J, Macedo A, Pato M, Pato C (1999): Using consensus OPCRIT diagnoses. An efficient procedure for best-estimate lifetime diagnoses. *Br J Psychiatry* 175: 154-7.
4. Craddock M, Asherson P, Owen MJ, Williams J, McGuffin P, Farmer AE (1996): Concurrent validity of the OPCRIT diagnostic system. Comparison of OPCRIT diagnoses with consensus best-estimate lifetime diagnoses. *Br J Psychiatry* 169(1): 58-63.
5. Herken H, Uz E, Ozyurt H, Sogut S, Virit, O, Akyol O (2001): Evidence that the activities of erythrocyte free radical scavenging enzymes and the products of lipid peroxidation are increased in different forms of schizophrenia. *Mol Psychiatry* 6(1): 66-73.
6. Kane J, Honigfeld G, Singer J, Meltzer H (1988): Clorazil Collaborative Study Group. Clozapine for the Treatment Resistant Schizophrenic: A Double-Blind Comparison with Clorpromazine. *Arch Gen Psychiatry* 45: 789-796.
7. Khan MM, Evans DR, Gunna V, Scheffer RE, Parikh VV, Mahadik SP (2002): Reduced erythrocyte membrane essential fatty acids and increased lipid peroxides in schizophrenia at the never-medicated first-episode of psychosis and after years of treatment with antipsychotics. *Schizophr Res* 58(1): 1-10.
8. Lohr JB (1991): Oxygen radicals and neuropsychiatric illness. Some speculations. *Arch Gen Psychiatry* 48: 1097-1106.
9. Lohr JB, Browning JA (1995): Free radical involvement in neuropsychiatry illnesses. *Psychopharmacol Bull* 31 (1): 159-65.
10. Mahadik SP, Mukherjee S (1996): Free radical pathology and antioxidant defense in schizophrenia: a review. *Schizophr Res* 19(1): 1-17.
11. Mahadik SP, Mukherjee S, Scheffer R, Correnti EE, Mahadik JS (1998): Elevated plasma lipid peroxides at the onset of nonaffective psychosis. *Biol Psychiatry* 43(9): 674-9.
12. McCreddie RG, MacDonald E, Wiles D, Campbell G, Paterson JR (1995): The Nithsdale Schizophrenia Surveys. XIV: Plasma lipid peroxide and serum vitamin E levels in patients with and without tardive dyskinesia, and in normal subjects. *Br J Psychiatry* 167(5): 610-7.
13. McGuffin P, Farmer A, Harvey I (1991): A polydiagnostic application of operational criteria in studies of psychotic illness. Development and reliability of the OPCRIT system. *Arch Gen Psychiatry* 48(8): 764 -70.
14. Melamed Y, Sirota P, Dicker DR, Fishman P (1998): Superoxide anion production by neutrophils derived from peripheral blood of schizophrenic patients. *Psychiatry Res* 77 (1): 29-34.

15. Mirsa HP, Fridovich I (1972): The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 217(10): 3170-3175.
16. Mukerjee S, Mahadik SP, Scheffer R, Correnti EE, Kelkar H (1996): Impaired antioxidant defense at the onset of psychosis. *Schizophr Res* 19(1):19-26.
17. Parikh V, Khan MM, Mahadik SP (2003): Differential effects of antipsychotics on expression of antioxidant enzymes and membrane lipid peroxidation in rat brain. *J Psychiatr Res* 37: 43-51.
18. Petronijevic ND, Micic DV, Duricic B, Marinkovic D, Paunovic VR (2003): Substrate kinetics of erythrocyte membrane Na,K-ATPase and lipid peroxides in schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psych* 27(3): 431-40.
19. REDDY RD, YAO JK (1996): Free radical pathology in schizophrenia: a review. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 55(1-2): 33-43.
20. Reddy R, Keshavan M, Yao JK (2003): Reduced plasma antioxidants in first-episode patients with schizophrenia. *Schizophr Res* 62(3): 205-12.
21. Srivastava N, Barthwal MK, Dalal PK, Agarwal AK, Nag D, Srimal RC, Seth PK, Dikshit M (2001): Nitrite content and antioxidant enzyme levels in the blood of schizophrenia patients. *Psychopharmacology* 158(2): 140-5.
22. Wills ED. Mechanism of lipid peroxide formation in animal tissues (1966): *Biochem J* 99(5): 667-676.
23. Yao JK, Reddy R, McElhinny LG, van Kammen DP (1998a): Reduced status of plasma total antioxidant capacity in schizophrenia. *Schizophr Res* 32(1): 1-8.
24. Yao JK, Reddy R, McElhinny LG, van Kammen DP (1998b): Effects of haloperidol on antioxidant defense system enzymes in schizophrenia. *J Psychiatr Res* 32(6): 385-91.
25. Zhang XY, Zhou DF, Cao LY, Zhang PY, Wu GY (2003a): Elevated blood superoxide dismutase in neuroleptic-free schizophrenia: association with positive symptoms. *Psychiatry Res* 117(1): 85-8.
26. Zhang XY, Zhou DF, Cao LY, Zhang PY, Wu GY, Shen YC (2003b): The effect of risperidone treatment on superoxide dismutase in schizophrenia. *J Clin Psychopharmacol* 23(2): 128-31.

Table 1
Blood SOD levels in schizophrenic (schiz) patients and normal control subjects

Group	N	SOD (USOD/g)	t	d.f.	P
Schiz	17	7.1106±2.9877	3.592	30	0.001
Controls	15	4.0013±1.6095			

Mean ± S.D.

Table 2
Blood TBARS levels in schizophrenic (schiz) patients and normal control subjects

Group	N	TBARS (nmol/ml)	t	d.f.	P
Schiz	17	3.8276±0.8454	4.668	30	0.0001
Controls	15	2.5380±0.6977			

Mean ± S.D.

Table 3
Blood SOD levels in schizophrenic patients under haloperidol or clozapine

Group	N	SOD (USOD/g)	t	d.f.	P
Haloperidol	10	6.8740±3.5469	-0.380	15	0.710
Clozapine	07	7.4486±2.1691			

Mean ± S.D.

Table 4
Blood TBARS levels in schizophrenic patients under haloperidol or clozapine

Group	N	TBARS (nmol/ml)	t	d.f.	P
Haloperidol	10	3.4040±0.6731	-3.039	15	0.008
Clozapine	07	4.4329±0.7070			

Mean ± S.D.

6 – ARTIGO CIENTÍFICO EM PORTUGUÊS (ESTUDO1)

Níveis séricos elevados de superóxido dismutase e dos produtos de reação com o ácido tiobarbitúrico em pacientes esquizofrênicos cronicamente medicados

Clarissa Severino Gama ^{a, *}, Mirian Salvador ^b, Ana Cristina Andrezza ^b, Flavio Kapczinski ^a, Paulo Silva Belmonte-de-Abreu ^a

^aDepartamento de Psiquiatria, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Programa de Pós-Graduação em Psiquiatria, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Ramiro Barcelos, 2350, Porto Alegre, RS, 90035-003, Brazil

^bInstituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Rua Francisco Getulio Vargas 1130, Caxias do Sul, RS, 95070-560, Brazil

***Autor Correspondente**

Clarissa Severino Gama
Rua Passo da Pátria, 579/301
Porto Alegre – RS – Brazil
90460-060
E-mail: csgama@yahoo.com

Resumo

Existe uma larga evidência que os radicais livres podem ter um papel importante na patofisiologia da esquizofrenia. Problemas com a defesa antioxidante e aumento da peroxidação lipídica foram relatados previamente em pacientes esquizofrênicos em primeiro episódio, virgens de tratamento e naqueles cronicamente medicados com neurolépticos típicos. Nós medimos os níveis séricos de atividade da superóxido dismutase (SOD) e os níveis séricos dos produtos de reação com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) em dois grupos de pacientes esquizofrênicos (DSM-IV) cronicamente medicados, usando haloperidol (n=10) ou clozapina (n=7) e em um grupo de controles saudáveis (n=15). A SOD e a TBARS séricas foram significativamente mais altas ($p=0,001$) nos pacientes esquizofrênicos ($7,1106 \pm 2,9877$ e $3,8276 \pm 0,8454$) do que nos controles ($4,0013 \pm 1,6095$ e $2,5380 \pm 0,6977$). Entre os pacientes, a TBARS foi significativamente mais alta ($p=0,008$) naqueles usando clozapina ($4,4329 \pm 0,7070$) do que naqueles usando haloperidol ($3,4040 \pm 0,6731$), mas não os níveis de SOD ($p=0,710$), a média \pm DP de SOD foi de $7,4486 \pm 2,1691$ para o grupo da clozapina e de $6,8740 \pm 3,5469$ para grupo do haloperidol. É razoável discutir que a diferença encontrada nos níveis de TBARS pode ser devido ao curso de doença e não devido ao medicamento. Entretanto, investigações futuras sobre a relação entre as enzimas antioxidantes e a peroxidação lipídica com o curso da esquizofrenia são necessárias. Além disto, é possível direcionar o questionamento para um desequilíbrio oxidante/antioxidante na esquizofrenia.

Palavras chave: Esquizofrenia, Enzimas Antioxidantes, Dano Peroxidativo, Desequilíbrio Oxidativo, Clozapina, Haloperidol

Introdução

Existe uma larga evidência que os radicais livres podem ter um papel importante na patofisiologia da esquizofrenia (Lohr et al., 1995; Mahadik et al., 1996; Reddy et al., 1996; Yao et al., 1998a). Problemas com a defesa antioxidante e aumento da peroxidação lipídica foram relatados previamente em pacientes esquizofrênicos em primeiro episódio, virgens de tratamento (Murkerjee et al., 1996; Mahadik et al., 1998; Khan et al., 2002; Arvindakshan et al., 2003; Reddy et al., 2003) e naqueles cronicamente medicados com neurolépticos típicos (McCreadie et al., 1995; Herken et al., 2001; Khan et al., 2002).

Vários peróxidos de lipídeos plasmáticos, como o Malondialdeído (MDA), medido pelos produtos de reação com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), foram estudados recentemente em esquizofrenia e encontrado evidências de níveis aumentados de produtos de peroxidação lipídica plasmática em pacientes sem uso de medicação (Arvindakshan et al., 2003; Mahadik et al., 1998; Petronijevic et al., 2003, Srivastava, 2001) e em uso de medicação (Akyol et al., 2002; Arvindakshan et al., 2003; Khan et al., 2002; Petronijevic et al., 2003) a maioria dos pacientes esquizofrênicos estudados estava usando neurolépticos típicos.

Muito do enfoque no mecanismo de defesa antioxidante está nas enzimas antioxidantes principais: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GSH-Px). Destas, a atividade da SOD tem sido mais freqüentemente estudada. Foi, recentemente, relatado níveis elevados de SOD correlacionados positivamente com sintomas positivos, em esquizofrênicos sem neurolépticos (Zhang et al., 2003a), redução de níveis séricos de SOD depois do tratamento com risperidona (Zhang et al., 2003b) e

aumento das atividades de SOD e de GSH-Px em pré-tratamento com haloperidol quando comparado com o período de tratamento com a droga (Yao et al., 1998b).

Parikh et al. (2003) evidenciou aumento da peroxidação lipídica e atividade diminuída de SOD no cérebro de ratos tratados cronicamente com haloperidol. Não houve nenhuma alteração nos níveis das enzimas antioxidantes e dos produtos peroxidação lipídica no cérebro de ratos tratados cronicamente com risperidona, olanzapina ou clozapina.

Devido à evidência na literatura de um possível aumento do estresse oxidativo na esquizofrenia, nós medimos a SOD e TBARS séricas em dois grupos de pacientes cronicamente medicados, usando haloperidol ou clozapina e em um grupo de controles normais.

Material e Métodos

Sujeitos

Dezessete pacientes ambulatoriais (12 homens e 5 mulheres), com idade média de 35 anos (± 10), tempo médio de duração da doença de 15 anos (± 7) e 15 controles saudáveis (11 homens e 4 mulheres), com idade média de 34 anos (± 10) foram incluídos neste protocolo de estudo que foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Todos os indivíduos eram não fumantes. Os pacientes foram diagnosticados esquizofrênicos pelos critérios do DSM-IV (McGuffin et al., 1991; Craddock et al., 1996; Azevedo et al., 1999). Nos controles saudáveis foram excluídas as principais doenças psiquiátricas, baseado em entrevista clínica e nos dados de prontuário. Os pacientes foram recrutados do Programa de Esquizofrenia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), RS e os controles eram, principalmente, indivíduos da equipe de trabalho. Todos os indivíduos foram informados do que se tratava o estudo e assinaram um termo de consentimento informado previamente à participação. Dez pacientes estavam em uso de haloperidol e sete pacientes estavam em uso de clozapina, nenhum apresentava discinesia tardia. Cada indivíduo teve 5 ml de sangue coletado por punção venosa em tubo sem anticoagulante, o soro foi obtido através de centrifugação a 3,000xg durante 5 minutos e mantido congelado a -70 C por até 6 meses, até o dia do ensaio.

Atividade da superóxido dismutase

A atividade da superóxido dismutase no plasma foi determinada espectrofotometricamente medindo a inibição da taxa de auto-formação de adrenocromo catalítico a 480nm em um meio de reação que contém 1mmol/l de adrenalina (pH 2) e 50 mmol/l de glicina (pH 10,2). Esta reação foi conduzida em temperatura constante de 30°C durante 3 minutos. A atividade enzimática é expressa em unidades de SOD por g de

proteína. Uma unidade é definida como a quantidade de enzima que inibe a taxa de formação de adrenocromo em 50% (Mirsa et al., 1972).

Determinação de níveis plasmáticos de MDA

Níveis plasmáticos de MDA foram medidos pelo método de TBARS, descrito por Wills (1966). A Peroxidação foi medida pela produção de MDA que em combinação com TBARS, um cromógeno rosa, que forma um feixe de absorção medido a 530 nm. Foram expressos resultados de MDA como nmol/ml.

Análise estatística

A análise foi executada pelo Produto Estatístico e Soluções de Serviço versão 10.0 Versão (SPSS). Comparações entre grupos foram feitas pelo teste T de Student. Foram avaliadas relações entre variáveis com o coeficiente de correlação de Pearson. Os dados foram apresentados como média \pm D.P.

Resultados

A média dos níveis séricos de SOD (Tabela 1) e a média dos níveis séricos de TBARS (Tabela 2) foram significativamente mais altas nos pacientes esquizofrênicos do que nos controles. Entre os pacientes não houve diferença significativa na média dos níveis séricos de SOD entre o grupo usando clozapina e o grupo usando haloperidol (Tabela 3), mas a média dos níveis séricos de TBARS foi significativamente mais alta no grupo usando clozapina do que no grupo usando haloperidol (Tabela 4). Os níveis séricos de SOD permaneceram significativamente mais altos em pacientes esquizofrênicos quando foram comparados separadamente os grupos usando haloperidol e clozapina com o grupo controle ($p=0,011$ e $0,001$), a mesma diferença foi observada com os níveis séricos de TBARS quando o grupo controle foi comparado separadamente com os grupos usando haloperidol e clozapina ($p=0,005$ e $0,0001$).

Adicionalmente, os níveis séricos de SOD e de TBARS não mostraram correlação com a duração da doença ($r = 0,126$, $p = 0,630$ para SOD e $r = - 0,101$, $p = 0,676$ para TBARS).

Discussão

Os achados presentes mostram uma evidência adicional do aumento do tônus oxidativo na esquizofrenia. Nós achamos atividade elevada de SOD e níveis séricos elevados de TBARS em pacientes esquizofrênicos cronicamente medicados comparados a controles; e níveis séricos elevados de TBARS, mas não de SOD, em pacientes usando clozapina comparados àqueles usando haloperidol. Nós também achamos uma falta de correlação entre os níveis de SOD e de TBARS com o tempo de duração da doença.

O achado de atividade sérica de SOD aumentada em esquizofrenia está de acordo com outros estudos prévios (Melamed et al., 1998; Zhang et al., 2003a). Isto já foi previamente mencionado como sendo uma resposta à oxidação aumentada nesta doença (Lohr et al. 1995) e sugere um aumento do tônus oxidativo na esquizofrenia.

Os níveis séricos aumentados de TBARS também estão de acordo com literatura (Akyol et al., 2002; Arvindakshan et al., 2003; Khan et al., 2002; Petronijevic et al., 2003), reforçando a idéia de algum dano oxidativo nesta doença e um possível desequilíbrio do processo oxidação/antioxidação.

Parikh et al. (2003) achou no cérebro de ratos um aumento da peroxidação lipídica naqueles animais tratados cronicamente com haloperidol, mas não nos tratados cronicamente com risperidona, olanzapina ou clozapina. Nós achamos níveis aumentados de um marcador sérico de peroxidação lipídica (TBARS) em pacientes com esquizofrenia tratados cronicamente com clozapina comparado a pacientes tratados cronicamente com haloperidol, resultados divergentes aos de Parikh. De qualquer maneira, estes resultados contrastantes podem ser devido às diferenças de espécie em cada estudo (ratos e

humanos), tecidos diferentes (cérebro e soro) e à ausência de esquizofrenia no estudo de Parikh.

Alguns estudos (Lohr, 1991; Lohr & Browning, 1995) têm apontado que o metabolismo das catecolaminas, especialmente da dopamina, está associado com a geração de radicais livres e que condições associadas ao aumento do metabolismo das catecolaminas podem aumentar o aporte de radicais (Zhang et al., 2003). Isto pode explicar os altos níveis de SOD e TBARS entre os pacientes esquizofrênicos. Entretanto, o aumento da peroxidação lipídica encontrada neste estudo, expressada pelos níveis elevados de TBARS, no grupo que usava clozapina, pode revelar um indício de gravidade da doença neste grupo. Uma vez que esta droga é formalmente indicada para um grupo específico de pacientes com esquizofrenia, nos quais os sintomas são refratários a outros neurolépticos (Kane et al., 1988), a clozapina pode não ser a real causa do aumento da peroxidação lipídica, ao invés disto, pode ser um indicador de gravidade da doença.

Contudo, para uma relação de causa-efeito, são necessários ensaios clínicos para chegar a conclusões mais precisas. Por outro lado, os achados deste estudo dão evidências para a necessidade de investigações adicionais sobre a relação entre as enzimas antioxidantes e a peroxidação lipídica com os subtipos de esquizofrenia e padrões de curso clínico nesta doença.

Agradecimentos: Este estudo foi realizado com o apoio do CAPES-CRICES (Brazil-Portugal International Cooperative Study #078/01), da FAPERGS (#0104804) e do FIPE-HCPA (#02396).

Referências Bibliográficas

1. Akyol O, Herken H, Uz E, Fadillioğlu E, Unal S, Sogut S, Ozyurt H, Savas HÁ (2002): The indices of endogenous oxidative and antioxidative processes in plasma from schizophrenic patients. The possible role of oxidant/antioxidant imbalance. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psych* 26(5): 995-1005.
2. Arvindakshan M, Sitasawad S, Debsikdar V, Ghate M, Evans D, Horrobin DF, Bennett C, Ranjekar PK, Mahadik SP (2003): Essential polyunsaturated fatty acid and lipid peroxide levels in never-medicated and medicated schizophrenia patients. *Biol Psychiatry* 53(1): 56-64.
3. Azevedo MH, Soares MJ, Coelho I, Dourado A, Valente J, Macedo A, Pato M, Pato C (1999): Using consensus OPCRIT diagnoses. An efficient procedure for best-estimate lifetime diagnoses. *Br J Psychiatry* 175: 154-7.
4. Craddock M, Asherson P, Owen MJ, Williams J, McGuffin P, Farmer AE (1996): Concurrent validity of the OPCRIT diagnostic system. Comparison of OPCRIT diagnoses with consensus best-estimate lifetime diagnoses. *Br J Psychiatry* 169(1): 58-63.
5. Herken H, Uz E, Ozyurt H, Sogut S, Virit, O, Akyol O (2001): Evidence that the activities of erythrocyte free radical scavenging enzymes and the products of lipid peroxidation are increased in different forms of schizophrenia. *Mol Psychiatry* 6(1): 66-73.
6. Kane J, Honigfeld G, Singer J, Meltzer H (1988): Clorazil Collaborative Study Group. Clozapine for the Treatment Resistant Schizophrenic: A Double-Blind Comparison with Clorpromazine. *Arch Gen Psychiatry* 45: 789-796.
7. Khan MM, Evans DR, Gunna V, Scheffer RE, Parikh VV, Mahadik SP (2002): Reduced erythrocyte membrane essential fatty acids and increased lipid peroxides in schizophrenia at the never-medicated first-episode of psychosis and after years of treatment with antipsychotics. *Schizophr Res* 58(1): 1-10.
8. Lohr JB (1991): Oxygen radicals and neuropsychiatric illness. Some speculations. *Arch Gen Psychiatry* 48: 1097-1106.
9. Lohr JB, Browning JA (1995): Free radical involvement in neuropsychiatry illnesses. *Psychopharmacol Bull* 31 (1): 159-65.
10. Mahadik SP, Mukherjee S (1996): Free radical pathology and antioxidant defense in schizophrenia: a review. *Schizophr Res* 19(1): 1-17.
11. Mahadik SP, Mukherjee S, Scheffer R, Correnti EE, Mahadik JS (1998): Elevated plasma lipid peroxides at the onset of nonaffective psychosis. *Biol Psychiatry* 43(9): 674-9.
12. McCreddie RG, MacDonald E, Wiles D, Campbell G, Paterson JR (1995): The Nithsdale Schizophrenia Surveys. XIV: Plasma lipid peroxide and serum vitamin E levels in patients with and without tardive dyskinesia, and in normal subjects. *Br J Psychiatry* 167(5): 610-7.
13. McGuffin P, Farmer A, Harvey I (1991): A polydiagnostic application of operational criteria in studies of psychotic illness. Development and reliability of the OPCRIT system. *Arch Gen Psychiatry* 48(8): 764 -70.
14. Melamed Y, Sirota P, Dicker DR, Fishman P (1998): Superoxide anion production by neutrophils derived from peripheral blood of schizophrenic patients. *Psychiatry Res* 77 (1): 29-34.

15. Mirsa HP, Fridovich I (1972): The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 217(10): 3170-3175.
16. Mukerjee S, Mahadik SP, Scheffer R, Correnti EE, Kelkar H (1996): Impaired antioxidant defense at the onset of psychosis. *Schizophr Res* 19(1):19-26.
17. Parikh V, Khan MM, Mahadik SP (2003): Differential effects of antipsychotics on expression of antioxidant enzymes and membrane lipid peroxidation in rat brain. *J Psychiatr Res* 37: 43-51.
18. Petronijevic ND, Micic DV, Duricic B, Marinkovic D, Paunovic VR (2003): Substrate kinetics of erythrocyte membrane Na,K-ATPase and lipid peroxides in schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psych* 27(3): 431-40.
19. REDDY RD, YAO JK (1996): Free radical pathology in schizophrenia: a review. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 55(1-2): 33-43.
20. Reddy R, Keshavan M, Yao JK (2003): Reduced plasma antioxidants in first-episode patients with schizophrenia. *Schizophr Res* 62(3): 205-12.
21. Srivastava N, Barthwal MK, Dalal PK, Agarwal AK, Nag D, Srimal RC, Seth PK, Dikshit M (2001): Nitrite content and antioxidant enzyme levels in the blood of schizophrenia patients. *Psychopharmacology* 158(2): 140-5.
22. Wills ED. Mechanism of lipid peroxide formation in animal tissues (1966): *Biochem J* 99(5): 667-676.
23. Yao JK, Reddy R, McElhinny LG, van Kammen DP (1998a): Reduced status of plasma total antioxidant capacity in schizophrenia. *Schizophr Res* 32(1): 1-8.
24. Yao JK, Reddy R, McElhinny LG, van Kammen DP (1998b): Effects of haloperidol on antioxidant defense system enzymes in schizophrenia. *J Psychiatr Res* 32(6): 385-91.
25. Zhang XY, Zhou DF, Cao LY, Zhang PY, Wu GY (2003a): Elevated blood superoxide dismutase in neuroleptic-free schizophrenia: association with positive symptoms. *Psychiatry Res* 117(1): 85-8.
26. Zhang XY, Zhou DF, Cao LY, Zhang PY, Wu GY, Shen YC (2003b): The effect of risperidone treatment on superoxide dismutase in schizophrenia. *J Clin Psychopharmacol* 23(2): 128-31.

Tabela 1
Níveis séricos de SOD em pacientes esquizofrênicos (esquizo) e em controles normais

Grupo	N	SOD (USOD/g)	t	d.f.	P
Esquizo	17	7,1106±2,9877	3,592	30	0,001
Controles	15	4,0013±1,6095			

Média ± D.P.

Tabela 2
Níveis séricos de TBARS em pacientes esquizofrênicos (esquizo) e em controles normais

Grupo	N	TBARS (nmol/ml)	t	d.f.	P
Esquizo	17	3,8276±0,8454	4,668	30	0,0001
Controles	15	2,5380±0,6977			

Média ± D.P.

Tabela 3
Níveis séricos de SOD em pacientes esquizofrênicos usando haloperidol ou clozapina

Grupo	N	SOD (USOD/g)	t	d.f.	P
Haloperidol	10	6,8740±3,5469	-0,380	15	0,710
Clozapina	07	7,4486±2,1691			

Média ± D.P.

Tabela 4
Níveis séricos de TBARS em pacientes esquizofrênicos usando haloperidol ou clozapina

Grupo	N	TBARS (nmol/ml)	t	d.f.	P
Haloperidol	10	3,4040±0,6731	-3,039	15	0,008
Clozapina	07	4,4329±0,7070			

Média ± D.P.

7 – ARTIGO CIENTÍFICO EM INGLÊS (ESTUDO 2)

Increased thiobarbituric acid reactive substances in chronically medicated schizophrenic female patients treated with clozapine

CS Gama ^{1,*}, M Salvador ², AC Andreazza ², FP Kapczinski ¹, PS Belmonte-de-Abreu ¹

¹Departamento de Psiquiatria, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Programa de Pós-Graduação em Psiquiatria, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Ramiro Barcelos, 2350, Porto Alegre, RS, 90035-003, Brazil

²Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Rua Francisco Getulio Vargas 1130, Caxias do Sul, RS, 95070-560, Brazil

***Corresponding Author**

Clarissa Severino Gama
Rua Passo da Pátria, 579/301
Porto Alegre – RS – Brazil
90460-060
E-mail: csgama@yahoo.com

Abstract

Gender differences in antioxidant defense and in lipid peroxidation has been reported in animals. Impaired antioxidant defense and increased lipid peroxidation has been previously reported in drug naïve, first episode and chronically medicated schizophrenic patients. We measured serum superoxide dismutases (SOD) and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in chronically medicated DSM-IV male and female schizophrenic patients (n=97), under *clozapine* or *other neuroleptics*. Age at schizophrenia onset was 20.2 ± 7.6 years (20 ± 7.1 for males and 20.6 ± 9.3 for females, $p=0.834$). Serum SOD and TBARS were not different among males and females as well as among patients taking clozapine or other neuroleptics. Males showed no difference in SOD and TBARS levels, in illness duration and in age at schizophrenia onset, between *clozapine* and *other neuroleptic* groups. Females showed no difference in SOD levels between both groups, TBARS were significantly higher in the *clozapine* group. Among females, there were no difference in illness duration time and in age at onset between *clozapine* and *other neuroleptic* groups. Serum SOD was not correlated with illness duration and age, the same happened to TBARS, for illness duration and for age. We suggest that elevated serum TBARS in female receiving clozapine might be related to earlier age at onset and a possible higher illness duration time, leading to poorer response to estrogen neuroprotective properties and antidopaminergic effect. Warranting the need of further investigations of estrogen role in gender difference of oxidant/antioxidant imbalance in schizophrenia.

Key words: Schizophrenia, Antioxidant Enzymes, Peroxidative Damage, Gender, Antipsychotics.

Introduction

Impaired antioxidant defense and increased lipid peroxidation has been reported in chronic medicated (1-3) and in drug naïve first episode schizophrenic patients (3-7).

Several plasma lipid peroxides, like Malondialdehyde (MDA), measured by the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), have been recently studied in schizophrenia, providing some evidence of increased levels of lipid peroxidation products in plasma of drug free (5,6,8,9) and medicated (3,6,8,10) schizophrenic patients, most of them under typical neuroleptics regimens.

The antioxidant defense mechanism has been studied by measurement of the key scavenging antioxidant enzymes activity. Of these, superoxide dismutase (SOD) has been the most frequently examined. It had been recently reported, elevated blood SOD levels associated with positive symptoms in neuroleptic-free schizophrenics (11), a significant reduction of SOD levels after risperidone treatment (12) and higher SOD and glutathione peroxidase activities in pretreatment drug free-condition compared to haloperidol treatment condition (13).

Parikh et al. (14) evidenced an increase of lipid peroxidation and decreased SOD activity in rats' brain chronically treated with haloperidol and no alteration in levels of antioxidant enzymes and in lipid peroxidation products in rats' brain chronically treated with risperidone, olanzapine or clozapine.

Coto-Montes et al. (15), studying lipid peroxidation and enzymes activity throughout the circadian cycle in Syrian hamster Harderian gland, found that peaks of lipid peroxidation

were about three times higher in female, compared to males. The same author evidenced that levels of SOD and glutathione peroxidase were about three or two times higher in females, respectively. Some research results (16) that verified the effects of repeated restraint stress on free radical production, lipid peroxidation, and total antioxidant reactivity (TAR) in the spinal cord of male and female rats, demonstrated gender differences in TAR and in the production of free radicals, both being increased in females.

Given the small evidence in literature of gender differences in scavenging antioxidant enzymes activity and plasma lipid peroxides levels, but a great evidence of increased oxidative stress in schizophrenia, we measured serum SOD and TBARS in chronically medicated male and female schizophrenic patients, under clozapine or other neuroleptics regimens. We also correlated serum SOD and TBARS levels with age and illness duration.

Material and Methods

Ninety seven chronically medicated schizophrenic outpatients (77 male and 20 female), mean age 35.1 ± 10.1 years (35.2 ± 10.1 years for male patients and 34.7 ± 10.4 years for female patients, $p=0.835$), age at schizophrenia onset 20.2 ± 7.6 years (20 ± 7.1 years for male patients and 20.6 ± 9.3 years for female patients, $p=0.834$), mean illness duration 15 ± 8.5 years (15.3 ± 8.8 years for male patients and 14.2 ± 7.5 years for female patients, $p=0.580$) were enrolled in this study protocol, which was approved by the Ethical Committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Forty-eight patients were taking clozapine and forty-nine patients were under other neuroleptic medication. Among males thirty-eight were medicated with clozapine and thirty-nine with other neuroleptics and, among female patients, ten were chronically medicated with clozapine and ten with other neuroleptic medication. Patients were recruited from the Schizophrenia Program of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), RS and they had to fulfill DSM-IV (17-19) criteria for schizophrenia. All subjects were advised about the procedure and signed the informed consent to participate in the study. Each of them had 5 ml blood samples collected by venipuncture without anticoagulants and serum was obtained by centrifugation at $3,000 \times g$ for 5 minutes and kept frozen at -70°C for up to 6 months, until the assay.

Superoxide dismutase activity

Superoxide dismutase activity was determined spectrophotometrically in plasma samples by measuring the inhibition of the rate of auto catalytic adrenochrome formation at 480nm in a reaction medium containing 1mmol/l adrenaline (pH 2) and 50 mmol/l glycine (pH

10,2). This reaction was conducted in constant temperature 30°C during 3 minutes. The enzymic activity is expressed as superoxide dismutase units per g of protein. One unit is defined as the amount of enzyme that inhibits the rate of adrenochrome formation in 50% (20).

Determination of plasma MDA levels

Levels of plasma MDA were measured by the TBARS method, described by Wills (21). Peroxidation was measured as the production of MDA which in combination with TBARS forms a pink chromogen i.e. compound whose absorbance at 530 nm was measured. MDA results were expressed as nmol/ml.

Statistical Analysis

Statistical Product and Service Solutions 10.0 Version (SPSS) performed analysis. Between-group comparisons were made by Mann-Whitney U test and Student's t-test, for non-parametric and parametric data, respectively. Relationships between variables were assessed with Spearman's product-moment correlation coefficient. Data was presented as mean \pm S.D.

Results

There were no difference in SOD activity ($P=0.64$) and TBARS levels ($P=0.71$) among males and females. Serum SOD and serum TBARS concentrations were not significantly different between patients under clozapine or other neuroleptics (Table 1). When male patients were separately analyzed, the same results of the whole group were found (Table 2). Among females serum SOD levels were not significantly different between *clozapine* and *other neuroleptic* groups, but serum TBARS concentrations were significantly higher in patients taking clozapine than in patients under other neuroleptics (Table 3).

No difference was found in schizophrenia age of onset in male (Table 4) and female (Table 5) patients taking clozapine or other neuroleptics. No significant difference was found in illness duration between *clozapine* and *other neuroleptic* groups, among male and female patients, separately analyzed (Table 6).

Additionally, serum SOD levels failed to show correlation with illness duration ($r = -0.064$, $p = 0.535$) and age ($r = -0.028$, $p = 0.784$), the same happened to TBARS levels, ($r = 0.130$, $p = 0.204$) for illness duration and ($r = 0.131$, $p = 0.200$) for age. Male and female serum SOD and TBARS levels were analysed separately. No correlation between SOD levels and age was found in male ($r = 0.028$, $p = 0.811$) and female ($r = -0.240$, $p = 0.308$) groups; between SOD and illness duration, no correlation was found in male group ($r = 0.019$, $p = 0.873$), but a negative correlation trend among SOD levels and illness duration was seen in females ($r = -0.417$, $p = 0.067$).

Discussion

The present findings provide evidence of lack of difference in serum SOD and TBARS levels between male and female schizophrenic patients, contrasting to other two literature findings of increased lipid peroxidation and scavenging antioxidant enzymes activity in Harderian gland of Syrian hamster females throughout the circadian cycle (15) and an increase in antioxidant reactivity and in the production of free radicals in spinal cord of female rats' during repeated restraint stress (16). These contrasting results might be due to differences in species of each study (Syrian hamster, rats and humans), different tissues (Harderian gland, spinal cord and serum), different situations (circadian cycle, repeated restraint stress and no specific situation) and the absence of schizophrenia in the other studies (15,16).

According to this study results, there was no evidence of difference in SOD and TBARS levels among schizophrenic patients taking clozapine or other neuroleptics. Parikh et al. (14) have found an increase of lipid peroxidation and decreased SOD activity in rats' brain chronically treated with haloperidol but not in rats' brain chronically treated with risperidone, olanzapine or clozapine. Once in the category of "*other neuroleptics*" used in this study there were patients taking risperidone, olanzapine and other atypical medication as well as typical medical such as haloperidol, we can't infer, based on our results that any neuroleptic might cause or not an increase of lipid peroxidation and a decrease in SOD activity. Probably the category called "*clozapine*" might be an indicative of illness severity in this group, since this drug is formally indicated to a specific group of schizophrenic patients whose symptoms are refractory to the other neuroleptics (22).

The separated analysis of the whole group regarding gender provided additional information on the lack of difference in SOD and TBARS levels among schizophrenic patients taking clozapine or other neuroleptics, in male patients group. However, these findings have provided some evidence of increased TBARS levels among female schizophrenic patients taking clozapine, but no evidence of SOD increased levels in the same group. Course of schizophrenia is more favorable in females (23); estradiol -17 β possesses neuroprotective properties (24) and antidopaminergic effect (25,26), what might explain the females' better outcome in schizophrenia and a better therapeutic response to antipsychotics. Once increased TBARS levels reflects an increase of lipid peroxidation in schizophrenic females that should be more protected against oxidative damage than schizophrenic males (24,27), the finding of increased TBARS in patients taking clozapine among females but not among males is challenging. It is important to consider some clinical predictors of better therapeutic response to clozapine: male gender, older age at onset of illness and shorter duration of illness (28). We could say that this female group treated with clozapine has none of these three predictors for a good response to this drug. This study found a higher illness duration time trend among females using clozapine ($p=0.069$) compared to females using other neuroleptics and a lower age at schizophrenia onset (19 years) than those reported in literature (29) for females (26 years). Some studies have reported diminished levels of estrogen (30,31) and other has found no correlation between prolactin and estradiol levels (32), in women with schizophrenia. In addition, Liao et al. (33) suggested that an earlier age at onset of schizophrenia in females might be responsible for poorer responses to estrogen neuroprotective effect in this disease.

Several studies reported an earlier age at schizophrenia onset in men (29,34,35). In this study, the age at schizophrenia onset was the same between male and female patients as

well as the age at schizophrenia onset between clozapine or other neuroleptic groups, among schizophrenic males and females, separately analyzed.

In summary, the present findings show no difference in serum SOD and TBARS levels between male and female schizophrenic patients and an elevated serum TBARS levels in chronically medicated schizophrenic female patients receiving clozapine. It is reasonable to suggest that this TBARS increase might be related to earlier age at schizophrenia onset and a possible higher illness duration time in this female group as well as a poorer disease outcome signed by clozapine use, leading to poorer response to estrogen properties and antidopaminergic effect. The findings of this study give compelling evidence for the need of further investigation of estrogen role in gender, age at onset and illness duration differences of oxidant/antioxidant imbalance in schizophrenia.

Acknowledgements: This study was supported by grants from CAPES-CRICES (Brazil-Portugal International Cooperative Study #078/01), FAPERGS (#0104804) and FIPE-HCPA (#02396).

References

1. McCreadie RG, MacDonald E, Wiles D, Campbell G & Paterson JR (1995). The Nithsdale Schizophrenia Surveys. XIV: Plasma lipid peroxide and serum vitamin E levels in patients with and without tardive dyskinesia, and in normal subjects. *British Journal of Psychiatry*, 167(5), 610-7.
2. Herken H, Uz E, Ozyurt H, Sogut S, Virit O & Akyol O (2001). Evidence that the activities of erythrocyte free radical scavenging enzymes and the products of lipid peroxidation are increased in different forms of schizophrenia. *Molecular Psychiatry*, 6(1), 66-73.
3. Khan MM, Evans DR, Gunna V, Scheffer RE, Parikh VV & Mahadik SP (2002). Reduced erythrocyte membrane essential fatty acids and increased lipid peroxides in schizophrenia at the never-medicated first-episode of psychosis and after years of treatment with antipsychotics. *Schizophrenia Research*, 58(1), 1-10.
4. Mukerjee, S., Mahadik, S.P., Scheffer, R., Correnti, E.E., Kelkar, H., 1996. Impaired antioxidant defense at the onset of psychosis. *Schizophrenia Research* 19(1), 19-26.
5. Mahadik SP, Mukherjee S, Scheffer R, Correnti EE & Mahadik JS (1998). Elevated plasma lipid peroxides at the onset of nonaffective psychosis. *Biological Psychiatry*, 43(9), 674-9.
6. Arvindakshan M, Sitasawad S, Debsikdar V, Ghate M, Evans D, Horrobin DF, Bennett C, Ranjekar PK & Mahadik SP (2003). Essential polyunsaturated fatty acid and lipid peroxide levels in never-medicated and medicated schizophrenia patients. *Biological Psychiatry*, 53(1), 56-64.
7. Reddy R, Keshavan M & Yao JK (2003). Reduced plasma antioxidants in first-episode patients with schizophrenia. *Schizophrenia Research*, 62(3), 205-12.
8. Petronijevic ND, Micic DV, Duricic B, Marinkovic D & Paunovic VR (2003). Substrate kinetics of erythrocyte membrane Na,K-ATPase and lipid peroxides in schizophrenia. *Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry*, 27(3), 431-40.
9. Srivastava N, Barthwal MK, Dalal PK, Agarwal AK, Nag D, Srimal RC, Seth PK & Dikshit M (2001). Nitrite content and antioxidant enzyme levels in the blood of schizophrenia patients. *Psychopharmacology*, 158(2), 140-5.
10. Akyol O, Herken H, Uz E, Fadillioglu E, Unal S, Sogut S, Ozyurt H & Savas HA (2002). The indices of endogenous oxidative and antioxidative processes in plasma from schizophrenic patients. The possible role of oxidant/antioxidant imbalance. *Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry*, 26(5), 995-1005.
11. Zhang XY, Zhou DF, Cao LY, Zhang PY & Wu GY (2003). Elevated blood superoxide dismutase in neuroleptic-free schizophrenia: association with positive symptoms. *Psychiatry Research*, 117(1), 85-8.
12. Zhang XY, Zhou DF, Cao LY, Zhang PY, Wu GY & Shen YC (2003). The effect of risperidone treatment on superoxide dismutase in schizophrenia. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, 23(2), 128-31.
13. Yao JK, Reddy R, McElhinny LG & van Kammen DP (1998). Effects of haloperidol on antioxidant defense system enzymes in schizophrenia. *Journal of Psychiatric Research*, 32(6), 385-91.
14. Parikh, V., Khan, M.M., Mahadik, S.P., 2003. Differential effects of antipsychotics on

- expression of antioxidant enzymes and membrane lipid peroxidation in rat brain. *Journal of Psychiatry Research* 37, 43-51.
15. Coto-Montes A, Boga JA, Tomas-Zapico C, Rodriguez-Colunga MJ, Martinez-Fraga J, Tolivia-Cadreja D, Menendez G, Hardeland R & Tolivia D (2001). Physiological oxidative stress model: Syrian hamster Harderian gland-sex differences in antioxidant enzymes. *Free Radical Biology and Medicine*, 30(7), 785-92.
 16. Tabajara AS, Fontella FU, Torres IL & Dalmaz C (2003). Gender differences in oxidative stress in spinal cord of rats submitted to repeated restraint stress. *Neurochemistry Research*, 28(9), 1315-20.
 17. McGuffin P, Farmer A & Harvey I (1991). A polydiagnostic application of operational criteria in studies of psychotic illness. Development and reliability of the OPCRIT system. *Archives of General Psychiatry*, 48(8), 764 -70.
 18. Craddock M, Asherson P, Owen MJ, Williams J, McGuffin P & Farmer AE (1996). Concurrent validity of the OPCRIT diagnostic system. Comparison of OPCRIT diagnoses with consensus best-estimate lifetime diagnoses. *British Journal of Psychiatry*, 169(1), 58-63.
 19. Azevedo MH, Soares MJ, Coelho I, Dourado A, Valente J, Macedo A, Pato M, & Pato C (1999). Using consensus OPCRIT diagnoses. An efficient procedure for best-estimate lifetime diagnoses. *British Journal of Psychiatry*, 175, 154-7.
 20. Mirsa HP & Fridovich I (1972). The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *Journal of Biological Chemistry*, 217(10), 3170-3175.
 21. Wills ED (1966). Mechanism of lipid peroxide formation in animal tissues. *Biochemistry Journal*, 99(5), 667-676.
 22. Kane J, Honigfeld G, Singer J & Meltzer H (1988). Clozapil Collaborative Study Group. Clozapine for the Treatment Resistant Schizophrenic: A Double-Blind Comparison with Chlorpromazine. *Archives of General Psychiatry*, 45, 789-796.
 23. Leung A & Chue P (2000). Sex differences in schizophrenia, a review of the literature. *Acta Psiquiatrica Scandinavica*, 401, 3-38.
 24. Rao ML & Kölch H (2003). Effects of estrogen on brain development and neuroprotection – implications for negative symptoms in schizophrenia. *Psychoneuroendocrinology*, 28, 83-96.
 25. Seeman MV & Lang M (1990). The role of estrogens in schizophrenia gender differences. *Schizophrenia Bulletin*, 16, 185-194.
 26. Häfner H, Behrens S, De-Vry J & Gattaz WF (1991). Östradiol enhances the vulnerability threshold for schizophrenia in women by early effect on dopaminergic neurotransmission. Evidence from an epidemiological study and from animal experiments. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, 241, 65-68.
 27. Vedder H, Anthes N, Stumm G, Würz C, Behl C & Krieg JC (1999). Estrogen hormones reduce lipid peroxidation in cells and tissues of central nervous system. *Journal of Neurochemistry*, 72(6), 2531-2539.
 28. Lieberman JA, Kane JM, Safferman AZ, Pollack S, Howard A, Szymanski S, Masiar SJ, Kronig MH, Cooper T & Novacenko H (1994). Predictors of response to clozapine. *Journal of Clinical Psychiatry*, 55 Suppl B, 126-8.

29. Ussall J, Araya S, Ochoa S, Busquets E, Gost A & Márquez M (2001). Gender differences in a sample of schizophrenic outpatients. *Comprehensive Psychiatry*, 42(4), 301-305.
30. Riecher-Rossler A, Hafner H, Stunbaun M, Maurer K & Schmidt R (1994). Can estradiol modulate schizophrenia symptomatology? *Schizophrenia Bulletin*, 20, 203-214.
31. Oades, R.D., Schepker, R., 1994. Serum gonadal steroid hormones in young schizophrenia patients. *Psychoneuroendocrinology* 19, 373-372.
32. Huber TJ, Rllnik J, Wilhems J, von zur Muhlen A, Emrich HM & Schneider U (2001). Estradiol levels in psychotic disorders. *Psychoneuroendocrinology*, 26, 27-53.
33. Liao DL, Chen H, Lee SM & Tsai SJ (2002). Estrogen supplementation for female schizophrenics treated with atypical atipsychotics. *General Hospital Psychiatry*, 24, 357-359.
34. Goldstein JM, Tsuang MT & Faraone SV (1989). Gender and schizophrenia: implications for understanding the nature of the disorder. *Psychiatry Research*, 28, 243-253.
35. Castle D, Sham P & Murray R (1998). Differences in distribution of ages at onset in males and females with schizophrenia. *Schizophrenia Research*, 33, 179-183.

Table 1
Blood SOD and TBARS levels in schizophrenic patients under clozapine or other neuroleptics

Medication	N	SOD (USOD/g)	P	TBARS (nmol/ml)	P
Clozapine	48	9.1672±4.4028	0.516	5.1810±1.5908	0.106
Other Neuroleptics	49	9.7963±4.6474		4.7328±1.5028	
Total	97	9.4850±4.5155		4.9546±1.5553	

Mean ± S.D.

Mann-Whitney U test

Table 2
Blood SOD and TBARS levels in male schizophrenic patients under clozapine or other neuroleptics

Medication	N	SOD (USOD/g)	P	TBARS (nmol/ml)	P
Clozapine	38	9.2455±4.5359	0.729	5.1947±1.7209	0.328
Other Neuroleptics	39	9.6528±4.7040		4.8512±1.6404	
Total	77	9.4518±4.5959		5.0207±1.6784	

Mean ± S.D.

Mann-Whitney U test

Table 3
Blood SOD and TBARS levels in female schizophrenic patients under clozapine or other neuroleptics

Medication	N	SOD (USOD/g)	P	TBARS (nmol/ml)	P
Clozapine	10	8.8700±4.6181	0.406	5.1290±1.0184	0.045*
Other Neuroleptics	10	10.3560±3.9857		4.2710±0.6211	
Total	20	9.6130±4.3023		4.7000±0.9315	

Mean ± S.D.

Mann-Whitney U test

Table 4
Schizophrenia onset age in male patients under clozapine or other neuroleptics

Group	N	<i>Age at onset (Years)</i>	t	<i>d.f.</i>	<i>P</i>
Clozapine	38	19.3947±6.7084	0.828	74	0.410
Other Neuroleptics	39	20.7436±7.5732			

Mean ± S.D.

Student's t-test

Table 5
Schizophrenia onset age in female patients under clozapine or other neuroleptics

Group	N	Age at onset (Years)	t	d.f.	P
Clozapine	10	19.3947±6.7084	0.828	74	0.410
Other Neuroleptics	10	20.7436±7.5732			

Mean ± S.D.

Student's t-test

Table 6
Illness duration (years) in male and female schizophrenic patients under clozapine or other neuroleptics

	Clozapine	Other neuroleptics	<i>P</i>
Male	14.1316±7.9633	16.3333±9.4905	0.377
Female	17.5000±8.0726	10.8000±5.4732	0.069

Mean ± S.D.

Mann-Whitney U test

8 – ARTIGO CIENTÍFICO EM PORTUGUÊS (ESTUDO 2)

Aumento dos produtos de reação com o ácido tiobarbitúrico em mulheres esquizofrênicas cronicamente medicadas com clozapina

CS Gama ^{1,*}, M Salvador ², AC Andreazza ², FP Kapczinski ¹, PS Belmonte-de-Abreu ¹

¹Departamento de Psiquiatria, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Programa de Pós-Graduação em Psiquiatria, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Ramiro Barcelos, 2350, Porto Alegre, RS, 90035-003, Brazil

²Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Rua Francisco Getulio Vargas 1130, Caxias do Sul, RS, 95070-560, Brazil

***Autor Correspondente**

Clarissa Severino Gama
Rua Passo da Pátria, 579/301
Porto Alegre – RS – Brazil
90460-060
E-mail: csgama@yahoo.com

Resumo

Diferenças entre os sexos quanto às defesas antioxidantes e à peroxidação lipídica têm sido relatados em animais. Problemas na defesa antioxidante e no aumento da peroxidação lipídica foi constatado em pacientes esquizofrênicos em primeiro episódio, virgens de tratamento e naqueles cronicamente medicados. Nós medimos a concentração sérica de superóxido dismutase (SOD) e dos produtos de reação com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) em homens e mulheres com diagnóstico de esquizofrenia pelo DSM-IV (n=97), cronicamente medicados, usando *clozapina* ou *outros neurolépticos*. A idade de início da esquizofrenia foi de 20.2 ± 7.6 anos (20 ± 7.1 para os homens e 20.6 ± 9.3 para as mulheres, $p=0.834$). Os níveis séricos de SOD e TBARS não foram diferentes entre homens e mulheres, bem como entre os pacientes usando *clozapina* ou outros neurolépticos. Os homens não mostraram diferença no tempo de duração da doença e na idade de início da doença entre os pacientes usando *clozapina* ou outros neurolépticos. As mulheres também não mostraram diferença quanto aos níveis de SOD, já os níveis de TBARS foram significativamente maiores nas pacientes usando *clozapina*. Entre as mulheres não houve diferença no tempo de duração da doença e na idade de início da doença entre os grupos usando *clozapina* ou outros neurolépticos. Os níveis de SOD e de TBARS não se correlacionaram com o tempo de duração da doença e com a idade. Nós sugerimos que os níveis elevados de TBARS nas mulheres usando *clozapina* possam estar relacionados à idade mais precoce de início da doença e a um possível maior tempo de doença, o que pode levar a uma pior resposta às propriedades neuroprotetoras do estrogênio e ao seu efeito antidopaminérgico. Estudos sobre o papel do estrogênio nas diferenças entre homens e mulheres no desequilíbrio oxidativo na esquizofrenia são necessários.

Palavras chave: Esquizofrenia, Enzimas Antioxidantes, Dano Peroxidativo, Gênero, Antipsicóticos.

Introdução

Problemas na defesa antioxidante e no aumento da peroxidação lipídica foi constatado em pacientes esquizofrênicos em primeiro episódio, virgens de tratamento (3-7) e naqueles cronicamente medicados (1-3).

Vários peróxidos de lipídeos plasmáticos, como o Malondialdeído (MDA), medido pelos produtos de reação com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), foram estudados recentemente em esquizofrenia e encontrado evidências de níveis aumentados de produtos de peroxidação lipídica plasmática em pacientes sem uso de medicação (5,6,8,9) e em uso de medicação (3,6,8,10) a maioria dos pacientes esquizofrênicos estudados estava usando neurolépticos típicos.

Muito do enfoque no mecanismo de defesa antioxidante está nas enzimas antioxidantes principais: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GSH-Px). Destas, a atividade da SOD tem sido mais freqüentemente estudada. Foi, recentemente, relatado níveis elevados de SOD correlacionados positivamente com sintomas positivos, em esquizofrênicos sem neurolépticos (11), redução de níveis séricos de SOD depois do tratamento com risperidona (12) e aumento das atividades de SOD e de GSH-Px em pré-tratamento com haloperidol quando comparado com o período de tratamento com a droga (13).

Parikh et al. (14) evidenciou aumento da peroxidação lipídica e atividade diminuída de SOD no cérebro de ratos tratados cronicamente com haloperidol. Não houve nenhuma alteração nos níveis das enzimas antioxidantes e dos produtos peroxidação lipídica no cérebro de ratos tratados cronicamente com risperidona, olanzapina ou clozapina.

Coto-Montes et al. (15) estudou a peroxidação lipídica e as atividades enzimáticas ao longo do círculo circadiano na glândula Harderiana de hamster sírios. Este autor encontrou que os picos de peroxidação lipídica foram cerca de três vezes mais altos nas fêmeas do que nos machos. O mesmo autor evidenciou que os níveis de SOD e de glutathiona peroxidase foram duas ou três vezes mais altos nas fêmeas, respectivamente. Alguns resultados de pesquisas (16) que verificaram a influência do estresse na produção de radicais livres, na peroxidação lipídica e na reatividade antioxidante total (TAR) na medula espinal de ratos machos e fêmeas, demonstraram diferenças entre os gêneros quanto ao TAR e à produção de radicais livres, sendo os dois aumentados nas fêmeas.

Devido à pequena evidência na literatura de diferenças plasmáticas nas enzimas antioxidantes e nos peróxidos de lipídios, mas uma grande evidência do aumento de estresse oxidativo na esquizofrenia, nós medimos os níveis séricos de SOD e TBARS em homens e mulheres esquizofrênicos, cronicamente medicados, usando clozapina ou outros neurolépticos. Nós também correlacionamos os níveis de SOD e TBARS com a idade e o tempo de doença.

Material e Métodos

Noventa e sete pacientes ambulatoriais (77 homens e 20 mulheres), com idade média de $35.1 \pm 10,1$ anos ($35,2 \pm 10,1$ anos para os homens e $34,7 \pm 10,4$ anos para as mulheres, $p=0,835$), idade no início da doença de $20,2 \pm 7,6$ anos ($20 \pm 7,1$ anos para os homens e $20,6 \pm 9,3$ anos para as mulheres, $p=0,834$), tempo médio de duração da doença de $15 \pm 8,5$ anos ($15,3 \pm 8,8$ anos para os homens e $14,2 \pm 7,5$ anos para as mulheres, $p=0,580$) foram incluídos neste protocolo de estudo que foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Quarenta e oito pacientes estavam usando clozapina e quarenta e nove outros neurolépticos. Entre os homens, trinta e oito estava medicado com clozapina e 39 com outros neurolépticos e, entre as mulheres, 10 estavam medicadas com clozapina e 10 com outros neurolépticos. Os pacientes foram diagnosticados esquizofrênicos pelos critérios do DSM-IV (17-19). Os pacientes foram recrutados do Programa de Esquizofrenia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), RS. Todos os indivíduos foram informados do que se tratava o estudo e assinaram um termo de consentimento informado previamente à participação. Cada indivíduo teve 5 ml de sangue coletado por punção venosa em tubo sem anticoagulante, o soro foi obtido através de centrifugação a $3,000xg$ durante 5 minutos e mantido congelado a -70 C por até 6 meses, até o dia do ensaio.

Atividade da superóxido dismutase

A atividade da superóxido dismutase no plasma foi determinada espectrofotometricamente medindo a inibição da taxa de auto-formação de adrenocromo catalítico a 480nm em um meio de reação que contém 1mmol/l de adrenalina (pH 2) e 50 mmol/l de glicina (pH 10,2). Esta reação foi conduzida em temperatura constante de 30°C

durante 3 minutos. A atividade enzimática é expressa em unidades de SOD por g de proteína. Uma unidade é definida como a quantidade de enzima que inibe a taxa de formação de adrenocromo em 50% (Mirsa et al., 1972).

Determinação de níveis plasmáticos de MDA

Níveis plasmáticos de MDA foram medidos pelo método de TBARS, descrito por Wills (1966). A Peroxidação foi medida pela produção de MDA que em combinação com TBARS, um cromógeno rosa, que forma um feixe de absorção medido a 530 nm. Foram expressos resultados de MDA como nmol/ml.

Análise estatística

A análise foi executada pelo Produto Estatístico e Soluções de Serviço Versão 10.0 (SPSS). Comparações entre grupos foram feitas pelos testes Mann-Whitney U e t de Student, para dados não paramétricos e paramétricos, respectivamente. Foram avaliadas relações entre variáveis com o coeficiente de correlação de Spearman. Os dados foram apresentados como média \pm D.P.

Resultados

Não houve diferença nos níveis de SOD ($P=0,64$) e de TBARS ($P=0,71$) entre homens e mulheres. As concentrações séricas de SOD e de TBARS não tiveram diferença significativa entre os pacientes usando clozapina ou outros neurolépticos (Tabela 1). Quando os pacientes do sexo masculino foram analisados separadamente, o mesmo resultado de todo grupo foi encontrado (Tabela 2). Entre as mulheres, os níveis séricos de SOD não foram diferentes entre as pacientes usando clozapina ou outros neurolépticos, mas as concentrações de TBARS foram significativamente maiores naquelas que estavam usando clozapina (Tabela 3).

Nenhuma diferença foi encontrada na idade de início da doença nos homens (Tabela 4) e mulheres (Tabela 5) usando clozapina ou outros neurolépticos. Nenhuma diferença foi constatada quanto ao tempo de duração da esquizofrenia entre os grupos usando clozapina ou outros neurolépticos, entre pacientes masculinos e femininos, analisados separadamente (Tabela 6).

Ainda, os níveis séricos de SOD não mostraram correlação com o tempo de duração da doença ($r = -0,064$, $p = 0,535$) e com a idade ($r = -0,028$, $p = 0,784$), o mesmo foi encontrado para os níveis séricos de TBARS ($r = 0,130$, $p = 0,204$) para o tempo de duração da doença e ($r = 0,131$, $p = 0,200$) e para a idade. Os níveis de SOD e TBARS foram analisados separadamente em homens e mulheres. Nenhuma correlação entre os níveis de SOD e idade foi vista nos homens ($r = 0,028$, $p = 0,811$) e nas mulheres ($r = -0,240$, $p = 0,308$); entre SOD e tempo de duração da doença, nenhuma correlação foi encontrada nos homens ($r = 0,019$, $p = 0,873$), mas uma tendência a correlação negativa

entre os níveis séricos de SOD e o tempo de duração da doença foi visto nas mulheres ($r = -0,417$, $p = 0,067$).

Discussão

Os presentes resultados não encontraram diferença nos níveis séricos de SOD e TBARS entre homens e mulheres com esquizofrenia, contrastando com outros dois relatos da literatura de aumento da peroxidação lipídica e de atividade das enzimas antioxidantes na glândula Harderiana de hamster sírios fêmeas ao longo do círculo circadiano (15) e um aumento da reatividade antioxidante na medula espinal de ratas fêmeas durante estresse repetido (16). Estes resultados contrastantes podem ser devido a diferentes espécies em cada estudo (humanos, ratos e hamsters sírios), diferentes tecidos (glândula Harderiana, medula espinal e soro), diferentes situações (círculo circadiano, estresse repetido e nenhuma situação específica) e pela ausência de esquizofrenia nos outros estudos (15,16).

De acordo com este estudo, não houve evidência de diferença nos níveis de SOD e de TBARS entre pacientes com esquizofrenia usando clozapina ou outros neurolépticos. Parikh et al. (14) encontrou aumento da peroxidação lipídica e diminuição da atividade de SOD no cérebro de ratos cronicamente tratados com haloperidol mas não em cérebro de ratos cronicamente tratados com risperidona, olanzapina ou clozapina. Uma vez que na categoria “*outros neurolépticos*”, usada neste estudo, existiam pacientes usando risperidona, olanzapina e outros atípicos, bem como típicos como o haloperidol, nós não podemos inferir, baseados nestes resultados, que algum neuroléptico possa causar ou não aumento da peroxidação lipídica e diminuição da atividade de SOD. Provavelmente a categoria chamada de “*clozapina*” possa ser um indicador de um grupo com quadro clínico mais grave, uma vez que esta droga é formalmente indicada para pacientes que possuem sintomas refratários a outros neurolépticos (22).

A análise estratificada por sexo forneceu uma informação adicional sobre não existir diferença nos níveis de SOD e TBARS entre os homens usando clozapina ou outros neurolépticos. Entretanto, entre as mulheres existiu alguma evidência de aumento dos níveis de TBARS nas pacientes que usavam clozapina, mas nenhuma diferença nos níveis de SOD. O curso da esquizofrenia é mais favorável nas mulheres (23); o estradiol - 17 β possui propriedades neuroprotetoras (24) e um efeito antidopaminérgico (25,26), o que pode explicar um melhor curso da esquizofrenia entre as mulheres e uma melhor resposta terapêutica aos neuroplépticos. Uma vez que o aumento de TBARS reflete um aumento da peroxidação lipídica nas pacientes do sexo feminino que, deveriam estar mais protegidas do dano oxidativo do que os homens com esquizofrenia (24,27), este achado do aumento de TBARS entre as pacientes do sexo feminino usando clozapina, mas não entre os pacientes do sexo masculino, é desafiador. É importante considerar alguns preditores clínicos de melhor resposta à clozapina: sexo masculino, idade mais avançada no início da doença e menor duração da doença (28). Podemos dizer que este grupo de pacientes do sexo feminino, tratadas com clozapina, possui nenhum destes preditores para uma boa resposta a esta droga. Este estudo encontrou uma tendência a um maior tempo de doença nas mulhres com esquizofrenia tratatdas com clozapina do que naquelas tratadas com outras drogas ($p=0,069$) e uma idade inferior de início da esquizofrenia (19 anos) do que a encontrada na literatura (29) para mulheres (26 anos). Alguns estudos falam sobre níveis diminuídos de estrógeno (30,31) e outros não encontraram correlação entre os níveis de prolactina e de estradiol (32), em mulheres com esquizofrenia. Além disto, Liao et al. (33) sugere que o início precoce da esquizofrenia em mulheres possa ser o responsável pela pior resposta ao efeito neuroprotetor dos estrogênios nesta doença.

Muitos estudos relatam que o início da esquizofrenia é mais precoce nos homens (29,34,35). Neste estudo a idade de início da esquizofrenia foi a mesma para homens e mulheres, bem como entre os pacientes de ambos os sexos que estavam usando clozapina ou outros neurolépticos.

Resumindo, os achados deste estudo mostraram não haver diferença nos níveis de SOD e de TBARS em homens e mulheres com diagnóstico de esquizofrenia, cronicamente medicadas com clozapina ou outros neurolépticos, e níveis elevados de TBARS em pacientes do sexo feminino em uso de clozapina. É razoável sugerir que este aumento de TBARS possa estar relacionado com o início precoce da esquizofrenia e a um possível maior tempo de doença, neste grupo de pacientes do sexo feminino com um pior curso clínico sinalizado pelo uso de clozapina, levando a uma pior resposta às propriedades neuroprotetoras e antidopaminérgicas do estrogênio. Os resultados deste estudo direcionam as evidências para a necessidade de investigações futuras sobre o papel dos estrógenos nas diferenças entre gênero, idade de início e duração da doença, referente ao desequilíbrio oxidativo na esquizofrenia.

Agradecimentos: Este estudo foi realizado com o apoio do CAPES-CRICES (Brazil-Portugal International Cooperative Study #078/01), da FAPERGS (#0104804) e do FIPE-HCPA (#02396).

Referências

1. McCreadie RG, MacDonald E, Wiles D, Campbell G & Paterson JR (1995). The Nithsdale Schizophrenia Surveys. XIV: Plasma lipid peroxide and serum vitamin E levels in patients with and without tardive dyskinesia, and in normal subjects. *British Journal of Psychiatry*, 167(5), 610-7.
2. Herken H, Uz E, Ozyurt H, Sogut S, Virit O & Akyol O (2001). Evidence that the activities of erythrocyte free radical scavenging enzymes and the products of lipid peroxidation are increased in different forms of schizophrenia. *Molecular Psychiatry*, 6(1), 66-73.
3. Khan MM, Evans DR, Gunna V, Scheffer RE, Parikh VV & Mahadik SP (2002). Reduced erythrocyte membrane essential fatty acids and increased lipid peroxides in schizophrenia at the never-medicated first-episode of psychosis and after years of treatment with antipsychotics. *Schizophrenia Research*, 58(1), 1-10.
4. Mukerjee, S., Mahadik, S.P., Scheffer, R., Correnti, E.E., Kelkar, H., 1996. Impaired antioxidant defense at the onset of psychosis. *Schizophrenia Research* 19(1), 19-26.
5. Mahadik SP, Mukherjee S, Scheffer R, Correnti EE & Mahadik JS (1998). Elevated plasma lipid peroxides at the onset of nonaffective psychosis. *Biological Psychiatry*, 43(9), 674-9.
6. Arvindakshan M, Sitasawad S, Debsikdar V, Ghate M, Evans D, Horrobin DF, Bennett C, Ranjekar PK & Mahadik SP (2003). Essential polyunsaturated fatty acid and lipid peroxide levels in never-medicated and medicated schizophrenia patients. *Biological Psychiatry*, 53(1), 56-64.
7. Reddy R, Keshavan M & Yao JK (2003). Reduced plasma antioxidants in first-episode patients with schizophrenia. *Schizophrenia Research*, 62(3), 205-12.
8. Petronijevic ND, Micic DV, Duricic B, Marinkovic D & Paunovic VR (2003). Substrate kinetics of erythrocyte membrane Na,K-ATPase and lipid peroxides in schizophrenia. *Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry*, 27(3), 431-40.
9. Srivastava N, Barthwal MK, Dalal PK, Agarwal AK, Nag D, Srimal RC, Seth PK & Dikshit M (2001). Nitrite content and antioxidant enzyme levels in the blood of schizophrenia patients. *Psychopharmacology*, 158(2), 140-5.
10. Akyol O, Herken H, Uz E, Fadillioglu E, Unal S, Sogut S, Ozyurt H & Savas HA (2002). The indices of endogenous oxidative and antioxidative processes in plasma from schizophrenic patients. The possible role of oxidant/antioxidant imbalance. *Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry*, 26(5), 995-1005.
11. Zhang XY, Zhou DF, Cao LY, Zhang PY & Wu GY (2003). Elevated blood superoxide dismutase in neuroleptic-free schizophrenia: association with positive symptoms. *Psychiatry Research*, 117(1), 85-8.
12. Zhang XY, Zhou DF, Cao LY, Zhang PY, Wu GY & Shen YC (2003). The effect of risperidone treatment on superoxide dismutase in schizophrenia. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, 23(2), 128-31.
13. Yao JK, Reddy R, McElhinny LG & van Kammen DP (1998). Effects of haloperidol on antioxidant defense system enzymes in schizophrenia. *Journal of Psychiatric Research*, 32(6), 385-91.

14. Parikh, V., Khan, M.M., Mahadik, S.P., 2003. Differential effects of antipsychotics on expression of antioxidant enzymes and membrane lipid peroxidation in rat brain. *Journal of Psychiatry Research* 37, 43-51.
15. Coto-Montes A, Boga JA, Tomas-Zapico C, Rodriguez-Colunga MJ, Martinez-Fraga J, Tolivia-Cadreja D, Menendez G, Hardeland R & Tolivia D (2001). Physiological oxidative stress model: Syrian hamster Harderian gland-sex differences in antioxidant enzymes. *Free Radical Biology and Medicine*, 30(7), 785-92.
16. Tabajara AS, Fontella FU, Torres IL & Dalmaz C (2003). Gender differences in oxidative stress in spinal cord of rats submitted to repeated restraint stress. *Neurochemistry Research*, 28(9), 1315-20.
17. McGuffin P, Farmer A & Harvey I (1991). A polydiagnostic application of operational criteria in studies of psychotic illness. Development and reliability of the OPCRIT system. *Archives of General Psychiatry*, 48(8), 764 -70.
18. Craddock M, Asherson P, Owen MJ, Williams J, McGuffin P & Farmer AE (1996). Concurrent validity of the OPCRIT diagnostic system. Comparison of OPCRIT diagnoses with consensus best-estimate lifetime diagnoses. *British Journal of Psychiatry*, 169(1), 58-63.
19. Azevedo MH, Soares MJ, Coelho I, Dourado A, Valente J, Macedo A, Pato M, & Pato C (1999). Using consensus OPCRIT diagnoses. An efficient procedure for best-estimate lifetime diagnoses. *British Journal of Psychiatry*, 175, 154-7.
20. Mirsa HP & Fridovich I (1972). The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *Journal of Biological Chemistry*, 217(10), 3170-3175.
21. Wills ED (1966). Mechanism of lipid peroxide formation in animal tissues. *Biochemistry Journal*, 99(5), 667-676.
22. Kane J, Honigfeld G, Singer J & Meltzer H (1988). Clozapine Collaborative Study Group. Clozapine for the Treatment Resistant Schizophrenic: A Double-Blind Comparison with Chlorpromazine. *Archives of General Psychiatry*, 45, 789-796.
23. Leung A & Chue P (2000). Sex differences in schizophrenia, a review of the literature. *Acta Psiquiatrica Scandinavica*, 401, 3-38.
24. Rao ML & Kölch H (2003). Effects of estrogen on brain development and neuroprotection – implications for negative symptoms in schizophrenia. *Psychoneuroendocrinology*, 28, 83-96.
25. Seeman MV & Lang M (1990). The role of estrogens in schizophrenia gender differences. *Schizophrenia Bulletin*, 16, 185-194.
26. Häfner H, Behrens S, De-Vry J & Gattaz WF (1991). Östradiol enhances the vulnerability threshold for schizophrenia in women by early effect on dopaminergic neurotransmission. Evidence from an epidemiological study and from animal experiments. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, 241, 65-68.
27. Vedder H, Anthes N, Stumm G, Würz C, Behl C & Krieg JC (1999). Estrogen hormones reduce lipid peroxidation in cells and tissues of central nervous system. *Journal of Neurochemistry*, 72(6), 2531-2539.
28. Lieberman JA, Kane JM, Safferman AZ, Pollack S, Howard A, Szymanski S, Masiar SJ, Kronig

- MH, Cooper T & Novacenko H (1994). Predictors of response to clozapine. *Journal of Clinical Psychiatry*, 55 Suppl B, 126-8.
29. Ussall J, Araya S, Ochoa S, Busquets E, Gost A & Márquez M (2001). Gender differences in a sample of schizophrenic outpatients. *Comprehensive Psychiatry*, 42(4), 301-305.
 30. Riecher-Rossler A, Hafner H, Stunbaun M, Maurer K & Schmidt R (1994). Can estradiol modulate schizophrenia symptomatology? *Schizophrenia Bulletin*, 20, 203-214.
 31. Oades, R.D., Schepker, R., 1994. Serum gonadal steroid hormones in young schizophrenia patients. *Psychoneuroendocrinology* 19, 373-372.
 32. Huber TJ, Rllnik J, Wilhems J, von zur Muhlen A, Emrich HM & Schneider U (2001). Estradiol levels in psychotic disorders. *Psychoneuroendocrinology*, 26, 27-53.
 33. Liao DL, Chen H, Lee SM & Tsai SJ (2002). Estrogen supplementation for female schizophrenics treated with atypical atipsychotics. *General Hospital Psychiatry*, 24, 357-359.
 34. Goldstein JM, Tsuang MT & Faraone SV (1989). Gender and schizophrenia: implications for understanding the nature of the disorder. *Psychiatry Research*, 28, 243-253.
 35. Castle D, Sham P & Murray R (1998). Differences in distribution of ages at onset in males and females with schizophrenia. *Schizophrenia Research*, 33, 179-183.

Tabela 1
Níveis séricos de SOD e TARS entre os esquizofrênicos em uso de clozapina e outros neurolépticos

Medicação	N	SOD (USOD/g)	P	TBARS (nmol/ml)	P
Clozapina	48	9,1672±4,4028	0,516	5,1810±1,5908	0,106
Outros Neurolépticos	49	9,7963±4,6474		4,7328±1,5028	
Total	97	9,4850±4,5155		4,9546±1,5553	

Média ± D.P.

Teste Mann-Whitney U

Tabela 2
Níveis séricos de SOD e TARS entre os homens esquizofrênicos em uso de clozapina e outros neurolépticos

Medicação	N	SOD (USOD/g)	P	TBARS (nmol/ml)	P
Clozapina	38	9,2455±4,5359	0,729	5,1947±1,7209	0,328
Outros Neurolepticos	39	9,6528±4,7040		4,8512±1,6404	
Total	77	9,4518±4,5959		5,0207±1,6784	

Média ± D.P.

Teste Mann-Whitney U

Tabela 3
Níveis séricos de SOD e TARS entre as mulheres esquizofrênicas em uso de clozapina e outros neurolépticos

Medication	N	SOD (USOD/g)	P	TBARS (nmol/ml)	P
Clozapina	10	8,8700±4,6181	0,406	5,1290±1,0184	0,045*
Outros Neurolépticos	10	10,3560±3,9857		4,2710±0,6211	
Total	20	9,6130±4,3023		4,7000±0,9315	

Média ± D.P.

Teste Mann-Whitney U

Tabela 4
Idade de início da esquizofrenia em homens esquizofrênicos tratados com clozapina ou outros neurolépticos

Grupo	N	Idade no início (Anos)	t	d.f.	P
Clozapina	38	19,3947±6,7084	0,828	74	0,410
Outros Neurolépticos	39	20,7436±7,5732			

Média ± D.P.

Teste t de Student

Tabela 5
Idade de início da esquizofrenia em mulheres esquizofrênicas tratadas com clozapina ou outros neurolépticos

Grupo	N	Idade no início (Anos)	t	d.f.	P
Clozapina	10	19,3947±6,7084	0,828	74	0,410
Outros Neurolépticos	10	20,7436±7,5732			

Média ± D.P.

Teste t de Student

Tabela 6
Tempo de duração da doença em homens e mulheres esquizofrênicos em uso de clozapina ou outros neurolépticos

Medicação	Clozapina	Outros neurolépticos	<i>P</i>
Homens	14,1316±7,9633	16,3333±9,4905	0,377
Mulheres	17,5000±8,0726	10,8000±5,4732	0,069

Média ± D.P.

Teste Mann-Whitney U

9 – ARTIGO CIENTÍFICO EM INGLÊS (ESTUDO 3)

Superoxide dismutase and thiobarbituric acid reactive substances associated to subtypes and clinical course of schizophrenia

Clarissa Severino Gama ^{a, *}, Mirian Salvador ^b, Ana Cristina Andrezza ^b, Flavio Kapczinski ^a, Paulo Silva Belmonte-de-Abreu ^a

^aDepartamento de Psiquiatria, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Programa de Pós-Graduação em Psiquiatria, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Ramiro Barcelos, 2350, Porto Alegre, RS, 90035-003, Brazil

^bInstituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Rua Francisco Getulio Vargas 1130, Caxias do Sul, RS, 95070-560, Brazil

***Corresponding Author**

Clarissa Severino Gama
Rua Passo da Pátria, 579/301
Porto Alegre – RS – Brazil
90460-060
E-mail: csgama@yahoo.com

Abstract

High levels of superoxide dismutase (SOD) - a key enzyme in antioxidant defense mechanism - were associated with positive symptoms in neuroleptic-free schizophrenic patients. SOD activity also seems to be increased in residual schizophrenia subtype compared to paranoid subtype. Recent studies provided some evidence of increased levels of lipid peroxidation products, measured by the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in schizophrenic patients. Animals' studies evidence among females higher levels of antioxidant enzymes and products of lipid peroxidation. We examined serum SOD and TBARS levels in different subtypes, gender and outcome of schizophrenia in 88 chronically medicated schizophrenic patients. Fifty-one patients were classified as schizophrenic paranoid type, 31 as disorganized and 6 as undifferentiated. There were 22 subjects with partial remission, 28 with marked symptoms and 38 with deterioration. Mean serum SOD and mean serum TBARS concentrations were not significantly different among different schizophrenia subtypes and between the three different outcomes. Stratification by gender failed to show any difference in SOD levels. TBARS levels were significantly higher in the male subgroup with marked symptoms, compared to the deteriorated group. Serum SOD and TBARS levels failed to show any correlation with BPRS scores. TBARS levels might be considered as a biological marker of state (a warning sign long before ship deterioration). This highly speculative conclusion can conduct to further studies of association of increased lipid peroxidation and disturbed behavior.

Key words: Schizophrenia, Oxidative stress, Peroxidative Damage, Gender, Clinical Course, Psychopathology

Introduction

Impaired antioxidant defense and increased lipid peroxidation has been reported in schizophrenia (Lohr and Browning, 1995; Mahadik and Murkerjee, 1996; Murkerjee et al., 1996; Reddy and Yao, 1996; Mahadik et al., 1998; Reddy et al, 2003).

Recent studies provided some evidence of increased levels of lipid peroxidation products, measured by the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), in plasma of drug free (Arvindakshan et al., 2003; Mahadik et al., 1998; Petronijevic et al., 2003, Srivastava, 2001) and medicated (Akyol et al., 2002; Arvindakshan et al., 2003; Khan et al., 2002; Petronijevic et al., 2003) schizophrenic patients.

High levels of superoxide dismutase (SOD), a key enzyme in antioxidant defense mechanism, were reported in neuroleptic-free schizophrenic patients (Zhang et al., 2003a) associated with positive symptoms. SOD activity seems to be increased in residual schizophrenia subtype compared to paranoid subtype (Herken et al., 2001). We found high SOD and TBARS levels in chronically medicated schizophrenic patients (results submitted to publication).

Animal's studies have reported higher SOD activity and lipid peroxidation products in female (Coto-Montes et al., 2001; Tabajara et al., 2003), but our findings in chronically medicated schizophrenic patients didn't support such gender difference (results submitted to publication). However, clinical course of schizophrenia is more favorable in females (Leung and Chue, 2000).

To elucidate whether oxidative stress and gender may have a pathophysiological role in schizophrenia subtypes, in clinical course and in psychopathological symptoms; the present study examined serum SOD and TBARS levels in different forms of schizophrenia and in different outcome patterns of this illness and their relationship to psychopathological symptoms in chronically medicated male and female schizophrenic patients.

Material and Methods

Eighty eight chronically medicated schizophrenic outpatients (68 male and 20 female), mean age 35.05 ± 9.92 years (35.15 ± 9.86 years for male patients and 34.70 ± 10.39 years for female patients, $p=0.86$), mean illness duration 15.14 ± 8.77 years (15.43 ± 9.13 years for male patients and 14.15 ± 7.54 years for female patients, $p=0.30$) were enrolled in this study protocol, which was approved by the Ethical Committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Patients were recruited from the Schizophrenia Program of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), RS and they had to fulfill DSM-IV (McGuffin et al., 1991; Craddock et al., 1996; Azevedo et al., 1999) criteria for schizophrenia. Patients were classified according to DSM-IV schizophrenia subtypes and an additional classification, according to the presence of psychotic symptoms (partial remission, marked symptoms, and deteriorated) in clinical course of illness (Ran et al., 2001; Nurnberger et al., 1994) was performed. Psychopathological state was measured with Brief Psychiatric Rating Scale (BPRS) (Thompson et al., 1994) by a trained psychiatrist. All subjects were advised about the procedure and signed the informed consent to participate in the study. Each of them had 5 ml blood samples collected by venipuncture without anticoagulants and serum was obtained by centrifugation at $3,000 \times g$ for 5 minutes and kept frozen at -70°C for up to 6 months, until the assay.

Superoxide dismutase activity

Superoxide dismutase activity was determined spectrophotometrically in plasma samples by measuring the inhibition of the rate of autocatalytic adrenochrome formation at 480nm in a reaction medium containing 1mmol/l adrenaline (pH 2) and 50mmol/l glycine (pH 10,2). This reaction was conducted in constant temperature 30°C during 3 minutes. The

enzymic activity is expressed as superoxide dismutase units per g of protein. One unit is defined as the amount of enzyme that inhibits the rate of adrenochrome formation in 50% (Mirsa et al., 1972).

Determination of plasma MDA levels

Levels of plasma MDA were measured by the TBARS method, described by Wills (1966). Peroxidation was measured as the production of MDA which in combination with TBARS forms a pink chromogen i.e. compound whose absorbance at 530 nm was measured. MDA results were expressed as nmol/ml.

Statistical Analysis

Analysis was performed by Statistical Product and Service Solutions 10.0 Version (SPSS). Between-group comparisons were made by Student's t-test, ANOVA test was performed to analyze variance between groups and multiple comparisons between groups were assessed by Tukey test. Relationships between variables were assessed with Pearson's product-moment correlation coefficient. Data were presented as mean \pm S.D.

Results

Fifty-one patients were classified as schizophrenic paranoid type, 31 as disorganized and 6 as undifferentiated. There were 22 subjects with partial remission, 28 with marked symptoms and 38 with deterioration.

Mean serum SOD and mean serum TBARS concentrations were not significantly different among different subtypes (paranoid, disorganized and undifferentiated) (Table 1) and between the three different outcomes (Table 2). Stratification by gender failed to show any difference (Tables 3 and 4) in women. Separate analyses of male patients also failed to reveal any SOD differences in paranoid, disorganized and undifferentiated DSM-IV schizophrenia subtypes (Table 5) and among three different outcomes (Table 6). Mean serum TBARS was the same (Table 5) among schizophrenia subtypes, but TBARS levels were significantly higher in the male subgroup with marked symptoms, compared to the deteriorated group (Table 6).

Psychopathological BPRS score was 58.39 ± 9.72 (57.88 ± 11.09 , for males and 59.57 ± 6.05 , for females, $p = 0.316$). Serum SOD ($r = 0.169$, $p = 0.440$) and TBARS ($r = -0.110$, $p = 0.616$) levels failed to show any correlation with BPRS scores.

Discussion

The present findings provide evidence of lack of differences in serum SOD and TBARS according to different schizophrenia subtypes (paranoid/disorganized/undifferentiated), even in males and females pooled together or separated. Additionally, there were no differences in SOD and TBARS levels in schizophrenic female patients with different outcomes. On the other hand, males had higher TBARS levels associated to “*marked symptoms*” status compared to the “*deteriorated*” group. We also found no correlation of SOD and TBARS levels with BPRS scores.

The idea of oxidative damage in the pathophysiology of schizophrenia as a result of oxidant/antioxidant imbalance has been extensively described in literature (Akyol et al., 2002; Arvindakshan et al., 2003; Khan et al., 2002; Mahadik et al., 1998; Petronijevic et al., 2003; Zhang et al., 2003a). Herken et al. (2001) also found higher levels of SOD activity in residual schizophrenia compared to paranoid subtype. Our results provide additional evidence of similarity in SOD and TBARS among different subtypes (paranoid, disorganized and undifferentiated). None patient in our sample fulfilled criteria for residual schizophrenia and this may be the reason of similarity in SOD and TBARS levels among the three groups. Once patients with residual schizophrenia subtype present symptoms in an attenuated form, the higher levels of SOD in this subgroup may sign a population of schizophrenics that performs a better superoxide radicals detoxification and, as a result, a less severe behavioral alterations than other schizophrenia subtypes. However, this finding deserves additional replication for precise conclusions about oxidative stress in schizophrenia subtypes.

Correlation of SOD activity and BPRS scores was report by Zhang et al. (2003a). In contrast, SOD activity wasn't correlated to psychopathological BPRS scores in this study.

Patients in Zhang's study were neuroleptic free and in our study were chronically medicated. Some studies have reported that SOD levels are lower in drug-naïve psychotic patients (Mukerjee et al., 1996), but others (Yao et al., 1998) found higher SOD activity in pretreatment drug free-condition compared to haloperidol treatment condition. It is possible that the differences among Zhang's and ours results could be related to medication status, given the evidence in literature regarding SOD levels and neuroleptics (Zhang et al., 2003b, Yao et al., 1998). Therefore, psychopathological scores increase without neuroleptics.

Additionally, there was no evidence of difference in different subgroups (partial remission, marked symptoms, and deteriorated) in SOD and TBARS levels. Nevertheless, male patients presented higher TBARS levels in *marked symptoms* group than in *deteriorated* group. Course of schizophrenia is considered to be more favorable in females (Leung and Chue, 2000); in case, estradiol -17 β possesses neuroprotective properties (Rao and Kölch, 2003) and antidopaminergic effect (Häfner et al., 1991; Seeman et al., 1990). This might explain the females' better outcome in schizophrenia, a better therapeutic response to antipsychotics and equilibrium in oxidant and antioxidant mechanisms. A high level of TBARS is a sign of peroxidative injury to membrane phospholipids. Neuronal functioning is affected by this injury either by changes in membrane fluidity or by alterations in membrane receptors' (Mahadik et al., 2001) what can cause neurotransmitter uptake and release impairment and even cell death. Elevated serum S100B protein, a sensitive marker of brain damage (Ingebrigtsen et al., 1999), was previously found in schizophrenia (Wiesmann et al., 1999; Lara et al., 2001; Rothermundt, 2001) and its elevated levels could indicate astrocyte activation or death or blood-brain-barrier dysfunction. Once increased TBARS levels reflect an increase of lipid peroxidation; and male patients usually display more severe symptoms than female, TBARS levels might be considered as a

biological marker of state (a warning sign long before ship deterioration). Although, this highly speculative conclusion drives to further investigations, in whether lipid peroxidation, changes in membrane fluidity and alterations in membrane receptors', might affect behavior.

Acknowledgements: This study was supported by grants from CAPES-CRICES (Brazil-Portugal International Cooperative Study #078/01), FAPERGS (#0104804) and FIPE-HCPA (#02396).

References

1. Akyol O, Herken H, Uz E, Fadillioglu E, Unal S, Sogut S, Ozyurt H, Savas HA. The indices of endogenous oxidative and antioxidative processes in plasma from schizophrenic patients. The possible role of oxidant/antioxidant imbalance. *Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry* 2002; 26(5): 995-1005.
2. Arvindakshan M, Sitasawad S, Debsikdar V, Ghate M, Evans D, Horrobin DF, Bennett C, Ranjekar PK, Mahadik SP. Essential polyunsaturated fatty acid and lipid peroxide levels in never-medicated and medicated schizophrenia patients. *Biological Psychiatry* 2003; 53(1): 56-64.
3. Azevedo MH, Soares MJ, Coelho I, Dourado A, Valente J, Macedo A, Pato M, Pato C. Using consensus OPCRIT diagnoses. An efficient procedure for best-estimate lifetime diagnoses. *British Journal of Psychiatry* 1999; 175: 154-7.
4. Craddock M, Asherson P, Owen MJ, Williams J, McGuffin P, Farmer AE. Concurrent validity of the OPCRIT diagnostic system. Comparison of OPCRIT diagnoses with consensus best-estimate lifetime diagnoses. *British Journal of Psychiatry* 1996; 169(1): 58-63.
5. Coto-Montes A, Boga JA, Tomas-Zapico C, Rodriguez-Colunga MJ, Martinez-Fraga J, Tolivia-Cadreja D, Menendez G, Hardeland R & Tolivia D. Physiological oxidative stress model: Syrian hamster Harderian gland-sex differences in antioxidant enzymes. *Free Radical Biology and Medicine* 2001; 30(7): 785-92.
6. Häfner H, Behrens S, De-Vry J, Gattaz WF. Öestradiol enhances the vulnerability threshold for schizophrenia in women by early effect on dopaminergic neurotransmission. Evidence from an epidemiological study and from animal experiments. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience* 1991; 241: 65-68.
7. Herken H, Uz E, Ozyurt H, Sogut S, Virit O, Akyol O. Evidence that the activities of erythrocyte free radical scavenging enzymes and the products of lipid peroxidation are increased in different forms of schizophrenia. *Molecular Psychiatry* 2001; 6(1): 66-73.
8. Ingebrigtsen T, Waterloo K, Jacobsen EA, Langbakk B, Romner B. Traumatic brain damage in minor head injury: relation of serum S-100 protein measurements to magnetic resonance imaging and neurobehavioral outcome. *Neurosurgery* 1999; 45: 468-475.
9. Khan MM, Evans DR, Gunna V, Scheffer RE, Parikh VV, Mahadik SP. Reduced erythrocyte membrane essential fatty acids and increased lipid peroxides in schizophrenia at the never-medicated first-episode of psychosis and after years of treatment with antipsychotics. *Schizophrenia Research* 2002; 58(1): 1-10.
10. Lara DR, Gama CS, Belmonte-de-Abreu P, Portela LV, Gonçalves CA, Fonseca M, Hauck S, Souza DO. Increased serum S100B protein in schizophrenia: a study in medication-free patients. *Journal of Psychiatric Research* 2001; 35(1): 11-4.
11. Leung A, Chue P. Sex differences in schizophrenia, a review of the literature. *Acta Psiquiatrica Scandinavica* 2000; 401: 3-38.
12. Lohr JB, Browning JA. Free radical involvement in neuropsychiatry illnesses. *Psychopharmacology Bulletin* 1995; 31 (1): 159-65.
13. Mahadik SP, Mukherjee S. Free radical pathology and antioxidant defense in schizophrenia: a

- review. Schizophrenia Research 1996; 19(1): 1-17.
14. Mahadik SP, Mukherjee S, Scheffer R, Correnti EE, Mahadik JS. Elevated plasma lipid peroxides at the onset of nonaffective psychosis. *Biological Psychiatry* 1998; 43(9): 674-9.
 15. Mahadik SP, Evans D, Lal H. Oxidative stress and role of antioxidant and ω -3 essential fatty acid supplementation in schizophrenia. *Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry* 2001; 25: 463-493.
 16. McGuffin P, Farmer A, Harvey I. A polydiagnostic application of operational criteria in studies of psychotic illness. Development and reliability of the OPCRIT system. *Archives of General Psychiatry* 1991; 48(8): 764 -70.
 17. Mirsa HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *Journal of Biological Chemistry* 1972; 217(10): 3170-3175.
 18. Mukerjee S, Mahadik SP, Scheffer R, Correnti EE, Kelkar H. Impaired antioxidant defense at the onset of psychosis. *Schizophrenia Research* 1996; 19(1): 19-26.
 19. Nurnberger Jr. JI, Blehar MC, Kaufmann CA, York-Cooler C, Simpson SG, Harkavy-Friedman J, Severe JB, Malaspina D, Reich T. Diagnostic interview for genetic studies. Rationale, unique features, and training. NIMH Genetics Initiative. *Archives of General Psychiatry* 1994; 51(11): 849-59.
 20. Petronijevic ND, Micic DV, Duricic B, Marinkovic D, Paunovic VR. Substrate kinetics of erythrocyte membrane Na,K-ATPase and lipid peroxides in schizophrenia. *Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry* 2003; 27(3): 431-40.
 21. Ran M, Xiang M, Huang M, Shan Y. Natural course of schizophrenia: 2-year follow-up study in a rural Chinese community. *British Journal of Psychiatry* 2001; 178: 154-158.
 22. Rao ML, Kölc H. Effects of estrogen on brain development and neuroprotection – implications for negative symptoms in schizophrenia. *Psychoneuroendocrinology* 2003; 28: 83-96.
 23. Reddy, R.D., Yao, J.K., 1996. Free radical pathology in schizophrenia: a review. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 55(1-2), 33-43.
 24. Reddy R, Keshavan M, Yao JK. Reduced plasma antioxidants in first-episode patients with schizophrenia. *Schizophrenia Research* 2003; 62(3): 205-12.
 25. Rothermundt M, Missler U, Arolt V, Peters M, Leadbeater J, Wiesmann M, Rudolf S, Wandinger KP, Kirchner H. Increased S100B blood levels in unmedicated and treated schizophrenic patients are correlated with negative symptomatology. *Molecular Psychiatry* 2001; 6:445-449.
 26. Seeman MV, Lang M. The role of estrogens in schizophrenia gender differences. *Schizophrenia Bulletin* 1990; 16: 185-194.
 27. Srivastava N, Barthwal MK, Dalal PK, Agarwal AK, Nag D, Srimal RC, Seth PK, Dikshit M. Nitrite content and antioxidant enzyme levels in the blood of schizophrenia patients. *Psychopharmacology* 2001; 158(2): 140-5.
 28. Tabajara AS, Fontella FU, Torres IL, Dalmaz C. Gender differences in oxidative stress in spinal

- cord of rats submitted to repeated restraint stress. *Neurochemistry Research* 2003; 28(9): 1315-20.
29. Thompson PA, Buckley PF, Meltzer HY. The brief psychiatric rating scale: effect of scaling system on clinical response assessment. *Journal of Clinical Psychopharmacology* 1994; 14:344-6.
 30. Wiesmann M, Wandinger KP, Missler U, Eckhoff D, Rothermundt M, Arolt V, Kirchner H. Elevated plasma levels of S-100b protein in schizophrenic patients. *Biological Psychiatry* 1999; 45: 1508-1511.
 31. Wills ED. Mechanism of lipid peroxide formation in animal tissues. *Biochemistry Journal* 1966; 99(5): 667-676.
 32. Yao JK, Reddy R, Mcelhinny LG, Van Kammen DP. Effects of haloperidol on antioxidant defense system enzymes in schizophrenia. *Journal of Psychiatric Research* 1998; 32(6): 385-91.
 33. Zhang XY, Zhou DF, Cao LY, Zhang PY, Wu GY. Elevated blood superoxide dismutase in neuroleptic-free schizophrenia: association with positive symptoms. *Journal of Psychiatric Research* 2003a; 117(1): 85-8.
 34. Zhang XY, Zhou DF, Cao LY, Zhang PY, Wu GY, Shen YC. The effect of risperidone treatment on superoxide dismutase in schizophrenia. *Journal of Clinical Psychopharmacology* 2003b; 23(2): 128-31.

Table 1
Blood SOD and TBARS levels among DSM-IV schizophrenia forms

Schizophrenia Forms	N	SOD (USOD/g)	P	TBARS (nmol/ml)	P
Paranoid	51	9.5771±4.8258	0.210	5.0178±1.5710	0.980
Disorganized	31	9.3245±4.3003		4.9490±1.3044	
Undifferentiated	6	12.8467±1.3050		5.0200±2.2759	
Total	88	9.7110±4.5388		4.9937±1.5179	

Mean ± S.D.

Table 2
Blood SOD and TBARS levels among the three groups of psychotic symptoms

Clinical Course	N	SOD (USOD/g)	P	TBARS (nmol/ml)	P
Partial Remission	22	10.3323±4.7738	0.636	4.7900±1.4767	0.070
Marked Symptoms	28	9.9011±4.5802		5.5361±1.7979	
Deteriorated	38	9.2113±4.4366		4.7121±1.2216	
Total	88	9.7110±4.5388		4.9937±1.5179	

Mean ± S.D.

Table 3
Blood SOD and TBARS levels among DSM-IV schizophrenia forms in female patients

Schizophrenia Forms	N	SOD (USOD/g)	P	TBARS (nmol/ml)	P
Paranoid	13	8.9900±3.9790	0.365	4.6377±0.8743	0.837
Disorganized	4	9.1350±6.2411		4.9600±1.4112	
Undifferentiated	3	12.9500±1.6553		4.6233±0.7081	
Total	20	9.7399±4.6366		4.7000±0.9315	

Mean ± S.D.

Table 4
Blood SOD and TBARS levels in female schizophrenic patients among the three groups of psychotic symptoms

Clinical Course	N	SOD (USOD/g)	P	TBARS (nmol/ml)	P
Partial Remission	4	10.2500±5.5388	0.929	4.4625±0.6690	0.854
Marked Symptoms	9	9.6755±3.9857		4.7911±0.9166	
Deterioration	7	9.1685±4.6461		4.7185±1.1633	
Total	20	9.6130±4.3023		4.7000±0.9315	

Mean ± S.D.

Table 5
Blood SOD and TBARS levels among DSM-IV schizophrenia forms in male patients

Schizophrenia Forms	N	SOD (USOD/g)	P	TBARS (nmol/ml)	P
Paranoid	38	9.7779±5.1160	0.491	5.1479±1.7376	0.837
Disorganized	27	9.3526±4.1034		4.9474±1.3166	
Undifferentiated	3	12.7433±1.2190		5.4167±3.4606	
Total	68	9.7399±4.6366		5.0801±1.6469	

Mean ± S.D.

Table 6
Blood SOD and TBARS levels in male schizophrenic patients among the three groups of psychotic symptoms

Clinical Course	N	SOD (USOD/g)	P	TBARS (nmol/ml)	P
Partial Remission	18	10.3506±4.7682	0.689	4.8628±1.6075	0.037*
Marked Symptoms	19	10.0079±4.9366		5.8889±2.0166 ^{&}	
Deteriorated	31	9.2210±4.4675		4.7106±1.2529 ^{&}	
Total	68	9.7399±4.6366		5.0801±1.6469	

Mean ± S.D.

*ANOVA

[&]P=0.035 (Tukey test) for mean TBARS levels between groups *Marked Symptoms* and *Deteriorated*

10 – ARTIGO CIENTÍFICO EM PORTUGUÊS (ESTUDO 3)

Superóxido dismutase e produtos de reação com o ácido tiobarbitúrico associados ao curso clínico e aos subtipos de esquizofrenia

Clarissa Severino Gama ^{a, *}, Mirian Salvador ^b, Ana Cristina Andreazza ^b, Flavio Kapczinski ^a, Paulo Silva Belmonte-de-Abreu ^a

^aDepartamento de Psiquiatria, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Programa de Pós-Graduação em Psiquiatria, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Ramiro Barcelos, 2350, Porto Alegre, RS, 90035-003, Brazil

^bInstituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Rua Francisco Getulio Vargas 1130, Caxias do Sul, RS, 95070-560, Brazil

***Autor Correspondente**

Clarissa Severino Gama
Rua Passo da Pátria, 579/301
Porto Alegre – RS – Brazil
90460-060
E-mail: csgama@yahoo.com

Resumo

Altos níveis de superóxido dismutase (SOD) – uma enzima chave do mecanismo antioxidante – foram associados aos sintomas positivos em pacientes esquizofrênicos sem uso de medicação. A atividade da SOD parece estar aumentada na esquizofrenia residual quando comparada a paranóide. Estudos recentes evidenciaram níveis aumentados dos produtos de peroxidação lipídica, medido pelos produtos de reação com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), no plasma de pacientes esquizofrênicos. Estudos em animais reportaram aumento da atividade de SOD e dos produtos de peroxidação lipídica em fêmeas. Nós examinamos os níveis séricos de SOD e TBARS em 88 homens e mulheres com esquizofrenia, cronicamente medicados, entre os diferentes subtipos da doença e diferentes cursos clínicos. Cinquenta e um pacientes preencheram critérios para esquizofrenia paranóide, 31 para desorganizada e 6 para indiferenciada. Vinte e dois pacientes estavam em remissão parcial dos sintomas psicóticos, 28 com sintomas marcados e 38 deteriorados. A média dos níveis séricos de SOD e TBARS não foram significativamente diferentes entre os subtipos de esquizofrenia e entre os diferentes cursos clínicos. A estratificação por sexo também não mostrou diferença nos níveis de SOD. Entre os homens, os níveis de TBARS foram significativamente maiores no grupo com sintomas marcados do que nos deteriorados. Os níveis séricos de SOD e TBARS não mostraram correlação com os escores na BPRS. Os níveis de TBARS podem vir a ser considerados como um marcador biológico de estado da doença (um alerta pré-deterioração). Esta conclusão altamente especulativa pode conduzir os estudos para uma possível associação entre peroxidação lipídica e distúrbios do comportamento.

Palavras-chave: Esquizofrenia, Estresse Oxidativo, Dano Peroxidativo, Gênero, Curso Clínico, Psicopatologia

Introdução

Problemas na defesa antioxidante e no aumento da peroxidação lipídica foi constatado em pacientes esquizofrênicos (Lohr and Browning, 1995; Mahadik and Murkerjee, 1996; Murkerjee et al., 1996; Reddy and Yao, 1996; Mahadik et al., 1998; Reddy et al, 2003).

Estudos recentes evidenciaram níveis aumentados dos produtos de peroxidação lipídica, medido pelos produtos de reação com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), no plasma de pacientes esquizofrênicos sem uso de medicação (Arvindakshan et al., 2003; Mahadik et al., 1998; Petronijevic et al., 2003, Srivastava, 2001) e medicados (Akyol et al., 2002; Arvindakshan et al., 2003; Khan et al., 2002; Petronijevic et al., 2003).

Altos níveis de superóxido dismutase (SOD), uma enzima chave no mecanismo de defesa antioxidante, foram relatados em pacientes esquizofrênicos sem uso de neurolépticos (Zhang et al., 2003a) associado aos sintomas positivos. A atividade da SOD parece estar aumentada na esquizofrenia residual comparada a esquizofrenia paranóide (Herken et al., 2001). Nós achamos altos níveis de SOD e TBARS em esquizofrênicos cronicamente medicados (resultados submetidos à publicação).

Estudos em animais reportaram aumento da atividade de SOD e dos produtos de peroxidação lipídica em fêmeas (Coto-Montes et al., 2001; Tabajara et al., 2003), mas nossos achados em pacientes esquizofrênicos cronicamente medicados não confirmaram esta diferença entre os sexos (resultados submetidos à publicação). Entretanto, o curso da esquizofrenia é mais favorável nas mulheres (Leung and Chue, 2000).

Para elucidar se o estresse oxidativo e o sexo podem ter um papel na patofisiologia da esquizofrenia, no curso clínico e nos sintomas psicopatológicos; o presente estudo examinou os níveis séricos de SOD e TBARS nas diferentes formas de esquizofrenia e nos diferentes cursos clínicos desta doença e sua relação com os sintomas psicopatológicos em homens e mulheres cronicamente medicados com diagnóstico de esquizofrenia.

Material e Métodos

Oitenta e oito pacientes esquizofrênicos ambulatoriais (68 homens e 20 mulheres), com idade média de $35,05 \pm 9,92$ anos ($35,15 \pm 9,86$ anos para os homens e $34,70 \pm 10,39$ anos para as mulheres, $p=0,86$), tempo médio de duração da doença de $15,14 \pm 8,77$ anos ($15,43 \pm 9,13$ anos para os homens e $14,15 \pm 7,54$ anos para as mulheres, $p=0,30$) foram incluídos neste protocolo de estudo que foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Os pacientes foram diagnosticados esquizofrênicos pelos critérios do DSM-IV (McGuffin et al., 1991; Craddock et al., 1996; Azevedo et al., 1999). Os pacientes foram recrutados do Programa de Esquizofrenia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), RS. Todos os indivíduos foram informados do que se tratava o estudo e assinaram um termo de consentimento informado previamente à participação. Os pacientes foram classificados de acordo com o subtipo de esquizofrenia do DSM-IV e uma classificação adicional, de acordo com a presença de sintomas psicóticos (remissão parcial, sintomas marcados e deterioração) no curso clínico da doença (Ran et al., 2001; Nurnberger et al., 1994), foi feita. O estado psicopatológico foi mensurado com a *Brief Psychiatric Rating Scale* (BPRS) (Thompson et al., 1994) por um psiquiatra treinado. Cada indivíduo teve 5 ml de sangue coletado por punção venosa em tubo sem anticoagulante, o soro foi obtido através de centrifugação a $3,000xg$ durante 5 minutos e mantido congelado a -70 C por até 6 meses, até o dia do ensaio.

Atividade da superóxido dismutase

A atividade da superóxido dismutase no plasma foi determinada espectrofotometricamente medindo a inibição da taxa de autoformação de adrenocromo catalítico a 480nm em um meio de reação que contém 1mmol/l de adrenalina (pH 2) e 50

mmol/l de glicina (pH 10,2). Esta reação foi conduzida em temperatura constante de 30°C durante 3 minutos. A atividade enzimática é expressa em unidades de SOD por g de proteína. Uma unidade é definida como a quantidade de enzima que inibe a taxa de formação de adrenocromo em 50% (Mirsa et al., 1972).

Determinação de níveis plasmáticos de MDA

Níveis plasmáticos de MDA foram medidos pelo método de TBARS, descrito por Wills (1966). A Peroxidação foi medida pela produção de MDA que em combinação com TBARS, um cromógeno rosa, que forma um feixe de absorção medido a 530 nm. Foram expressos resultados de MDA como nmol/ml.

Análise estatística

A análise foi executada pelo Produto Estatístico e Soluções de Serviço Versão 10.0 (SPSS). Comparações entre grupos foram feitas pelo teste t de Student, a análise da variância entre os grupos foi feita por ANOVA e comparações múltiplas entre os grupos foram feitas pelo teste de Tukey. Foram avaliadas relações entre variáveis com o coeficiente de correlação de Pearson. Os dados foram apresentados como média \pm D.P.

Resultados

Cinquenta e um pacientes foram classificados como esquizofrênicos do tipo paranóide, 31 como desorganizados e seis como indiferenciados. Vinte e dois sujeitos estavam em remissão parcial dos sintomas psicóticos, 28 com sintomas marcados e 38 deteriorados.

A média dos níveis séricos de SOD e TBARS não diferiram significativamente entre os subtipos de esquizofrenia (paranóide, desorganizada e indiferenciada) (Tabela 1) e entre os três diferentes cursos clínicos (Tabela 2). A estratificação por sexo também não mostrou diferença (Tabelas 3 e 4) nas mulheres. A análise separada dos homens não mostrou diferença nos níveis de SOD entre os subtipos de esquizofrenia paranóide, desorganizada e indiferenciada pelo DSM-IV (Tabela 5) e entre os três cursos clínicos (Tabela 6). A média dos níveis séricos de TBARS foi semelhante entre os subtipos de esquizofrenia (Tabela 5), mas os níveis de TBARS foram significativamente maiores no grupo com sintomas marcados do que nos deteriorados (Tabela 6).

A média dos escores na BPRS foi $58,39 \pm 9,72$ ($57,88 \pm 11,09$, para os homens e $59,57 \pm 6,05$, para as mulheres, $p = 0,316$). Os níveis séricos de SOD ($r = 0.169$, $p = 0.440$) e TBARS ($r = -0.110$, $p = 0.616$) não mostraram correlação com os escores na BPRS.

Discussão

Os presentes achados oferecem evidência sobre a falta de diferença nos níveis séricos de SOD e TBARS de acordo com o subtipo de esquizofrenia (paranóide/desorganizada/indiferenciada), mesmo em homens e mulheres analisados juntos ou separados. Além disto, não houve diferença nos níveis séricos de SOD e TBARS nas mulheres esquizofrênicas com diferentes cursos clínicos. Por outro lado, os homens esquizofrênicos apresentaram níveis mais altos de TBARS no grupo com sintomas psicóticos marcados do que no grupo com deterioração. Os níveis séricos de SOD e TBARS não mostraram correlação com os escores na BPRS.

A idéia sobre o envolvimento do dano oxidativo na patofisiologia da esquizofrenia, como resultado de um desequilíbrio entre os mecanismos oxidativos e antioxidativos, tem sido extensivamente descrita na literatura (Akyol et al., 2002; Arvindakshan et al., 2003; Khan et al., 2002; Mahadik et al., 1998; Petronijevic et al., 2003; Zhang et al., 2003a). Herken et al. (2001) também encontrou maiores níveis de SOD na esquizofrenia do tipo residual quando comparada à paranóide. Os nossos resultados fornecem uma evidência adicional sobre a similaridade nos níveis séricos de SOD e TBARS entre os diferentes subtipos (paranóide/desorganizada/indiferenciada). Nenhum paciente da nossa amostra preencheu critérios para esquizofrenia do tipo residual e isto pode ser a razão para a similaridade nos níveis de SOD e TBARS entre os três grupos. Uma vez que os pacientes com esquizofrenia do tipo residual apresentam sintomas de uma forma atenuada, os altos níveis de SOD neste subgrupo podem estar sinalizando uma população de esquizofrênicos que desempenham melhor a desintoxicação dos radicais de superóxido e, como resultado, apresentam alterações comportamentais menos severas do que as outras formas de esquizofrenia. Entretanto, este achado precisa ser replicado para que se

chegue a conclusões mais precisas sobre o estresse oxidativo nos subtipos de esquizofrenia.

A correlação entre os escores na BPRS e a atividade de SOD foi descrita por Zhang et al. (2003a). Em contraste, a atividade de SOD não mostrou correlação com os escores na BPRS, neste estudo. Os pacientes do estudo de Zhang estavam sem neurolépticos e os do nosso estudo estavam cronicamente medicados. Alguns estudos têm relatado que os níveis de SOD são menores em pacientes psicóticos virgens de tratamento (Mukerjee et al., 1996), mas outros (Yao et al., 1998) encontraram uma atividade de SOD maior em pacientes na condição de pré-tratamento quando comparados com a condição de tratamento com haloperidol. É possível que as diferenças encontradas entre os resultados de Zhang e os nossos possam estar relacionados à medicação, dada a evidência na literatura sobre os neurolépticos e os níveis de SOD (Zhang et al., 2003b, Yao et al., 1998). Portanto, os escores psicopatológicos aumentam sem o uso de neurolépticos.

Adicionalmente, não houve diferença nos diferentes grupos (remissão parcial, sintomas marcados, deterioração) quanto aos níveis de SOD e TABARS. Todavia, os homens apresentaram maiores níveis de TBARS no grupo com sintomas marcados do que no grupo com deterioração. O curso da esquizofrenia é considerado mais favorável nas mulheres (Leung and Chue, 2000); no caso, o estradiol -17β possui propriedades neuroprotetoras (Rao and Kölch, 2003) e efeito antidopaminérgico (Häfner et al., 1991; Seeman et al., 1990). Isto poderia explicar, nas mulheres, o melhor prognóstico na esquizofrenia, a melhor resposta terapêutica aos antipsicóticos e o equilíbrio entre os mecanismos oxidantes e antioxidantes. Um alto nível de TBARS é um sinal de dano peroxidativo aos fosfolípidos de membrana. O funcionamento neuronal é afetado por este dano, tanto pelas mudanças na fluidez da membrana, quanto pelas alterações nos

receptores de membrana (Mahadik et al., 2001), o que pode causar problemas na liberação e recaptção de neurotransmissores e, até, morte celular. Nível sérico elevado da proteína S100B, um marcador sensível de dano cerebral (Ingebrigtsen et al., 1999), foi previamente encontrado em esquizofrenia (Wiesmann et al., 1999; Lara et al., 2001; Rothermundt, 2001) e a sua elevação pode indicar ativação ou morte de astrócitos e disfunção da barreira hematoencefálica. Uma vez que os níveis aumentados de TBARS refletem um aumento na peroxidação lipídica; e os homens, usualmente, têm sintomas mais severos do que as mulheres, os níveis de TBARS poderiam ser considerados como um marcador biológico de estado da doença (um alerta pré-deterioração). Contudo, esta conclusão altamente especulativa pode conduzir os estudos para verificar se a peroxidação lipídica, as mudanças na fluidez de membrana e as alterações nos receptores de membrana podem afetar o comportamento.

Agradecimentos: Este estudo foi realizado com o apoio do CAPES-CRICES (Brazil-Portugal International Cooperative Study #078/01), da FAPERGS (#0104804) e do FIPE-HCPA (#02396).

Referências Bibliográficas

1. Akyol O, Herken H, Uz E, Fadillioglu E, Unal S, Sogut S, Ozyurt H, Savas HA. The indices of endogenous oxidative and antioxidative processes in plasma from schizophrenic patients. The possible role of oxidant/antioxidant imbalance. *Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry* 2002; 26(5): 995-1005.
2. Arvindakshan M, Sitasawad S, Debsikdar V, Ghate M, Evans D, Horrobin DF, Bennett C, Ranjekar PK, Mahadik SP. Essential polyunsaturated fatty acid and lipid peroxide levels in never-medicated and medicated schizophrenia patients. *Biological Psychiatry* 2003; 53(1): 56-64.
3. Azevedo MH, Soares MJ, Coelho I, Dourado A, Valente J, Macedo A, Pato M, Pato C. Using consensus OPCRIT diagnoses. An efficient procedure for best-estimate lifetime diagnoses. *British Journal of Psychiatry* 1999; 175: 154-7.
4. Craddock M, Asherson P, Owen MJ, Williams J, McGuffin P, Farmer AE. Concurrent validity of the OPCRIT diagnostic system. Comparison of OPCRIT diagnoses with consensus best-estimate lifetime diagnoses. *British Journal of Psychiatry* 1996; 169(1): 58-63.
5. Coto-Montes A, Boga JA, Tomas-Zapico C, Rodriguez-Colunga MJ, Martinez-Fraga J, Tolivia-Cadreja D, Menendez G, Hardeland R & Tolivia D. Physiological oxidative stress model: Syrian hamster Harderian gland-sex differences in antioxidant enzymes. *Free Radical Biology and Medicine* 2001; 30(7): 785-92.
6. Häfner H, Behrens S, De-Vry J, Gattaz WF. Öestradiol enhances the vulnerability threshold for schizophrenia in women by early effect on dopaminergic neurotransmission. Evidence from an epidemiological study and from animal experiments. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience* 1991; 241: 65-68.
7. Herken H, Uz E, Ozyurt H, Sogut S, Virit O, Akyol O. Evidence that the activities of erythrocyte free radical scavenging enzymes and the products of lipid peroxidation are increased in different forms of schizophrenia. *Molecular Psychiatry* 2001; 6(1): 66-73.
8. Ingebrigtsen T, Waterloo K, Jacobsen EA, Langbakk B, Romner B. Traumatic brain damage in minor head injury: relation of serum S-100 protein measurements to magnetic resonance imaging and neurobehavioral outcome. *Neurosurgery* 1999; 45: 468-475.
9. Khan MM, Evans DR, Gunna V, Scheffer RE, Parikh VV, Mahadik SP. Reduced erythrocyte membrane essential fatty acids and increased lipid peroxides in schizophrenia at the never-medicated first-episode of psychosis and after years of treatment with antipsychotics. *Schizophrenia Research* 2002; 58(1): 1-10.
10. Lara DR, Gama CS, Belmonte-de-Abreu P, Portela LV, Gonçalves CA, Fonseca M, Hauck S, Souza DO. Increased serum S100B protein in schizophrenia: a study in medication-free patients. *Journal of Psychiatric Research* 2001; 35(1): 11-4.
11. Leung A, Chue P. Sex differences in schizophrenia, a review of the literature. *Acta Psiquiatrica Scandinavica* 2000; 401: 3-38.
12. Lohr JB, Browning JA. Free radical involvement in neuropsychiatry illnesses. *Psychopharmacology Bulletin* 1995; 31 (1): 159-65.
13. Mahadik SP, Mukherjee S. Free radical pathology and antioxidant defense in schizophrenia: a

- review. Schizophrenia Research 1996; 19(1): 1-17.
14. Mahadik SP, Mukherjee S, Scheffer R, Correnti EE, Mahadik JS. Elevated plasma lipid peroxides at the onset of nonaffective psychosis. *Biological Psychiatry* 1998; 43(9): 674-9.
 15. Mahadik SP, Evans D, Lal H. Oxidative stress and role of antioxidant and ω -3 essential fatty acid supplementation in schizophrenia. *Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry* 2001; 25: 463-493.
 16. McGuffin P, Farmer A, Harvey I. A polydiagnostic application of operational criteria in studies of psychotic illness. Development and reliability of the OPCRIT system. *Archives of General Psychiatry* 1991; 48(8): 764 -70.
 17. Mirsa HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *Journal of Biological Chemistry* 1972; 247(10): 3170-3175.
 18. Mukerjee S, Mahadik SP, Scheffer R, Correnti EE, Kelkar H. Impaired antioxidant defense at the onset of psychosis. *Schizophrenia Research* 1996; 19(1): 19-26.
 19. Nurnberger Jr. JI, Blehar MC, Kaufmann CA, York-Cooler C, Simpson SG, Harkavy-Friedman J, Severe JB, Malaspina D, Reich T. Diagnostic interview for genetic studies. Rationale, unique features, and training. NIMH Genetics Initiative. *Archives of General Psychiatry* 1994; 51(11): 849-59.
 20. Petronijevic ND, Micic DV, Duricic B, Marinkovic D, Paunovic VR. Substrate kinetics of erythrocyte membrane Na,K-ATPase and lipid peroxides in schizophrenia. *Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry* 2003; 27(3): 431-40.
 21. Ran M, Xiang M, Huang M, Shan Y. Natural course of schizophrenia: 2-year follow-up study in a rural Chinese community. *British Journal of Psychiatry* 2001; 178: 154-158.
 22. Rao ML, Kölc H. Effects of estrogen on brain development and neuroprotection – implications for negative symptoms in schizophrenia. *Psychoneuroendocrinology* 2003; 28: 83-96.
 23. Reddy, R.D., Yao, J.K., 1996. Free radical pathology in schizophrenia: a review. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 55(1-2), 33-43.
 24. Reddy R, Keshavan M, Yao JK. Reduced plasma antioxidants in first-episode patients with schizophrenia. *Schizophrenia Research* 2003; 62(3): 205-12.
 25. Rothermundt M, Missler U, Arolt V, Peters M, Leadbeater J, Wiesmann M, Rudolf S, Wandinger KP, Kirchner H. Increased S100B blood levels in unmedicated and treated schizophrenic patients are correlated with negative symptomatology. *Molecular Psychiatry* 2001; 6:445-449.
 26. Seeman MV, Lang M. The role of estrogens in schizophrenia gender differences. *Schizophrenia Bulletin* 1990; 16: 185-194.
 27. Srivastava N, Barthwal MK, Dalal PK, Agarwal AK, Nag D, Srimal RC, Seth PK, Dikshit M. Nitrite content and antioxidant enzyme levels in the blood of schizophrenia patients. *Psychopharmacology* 2001; 158(2): 140-5.
 28. Tabajara AS, Fontella FU, Torres IL, Dalmaz C. Gender differences in oxidative stress in spinal

- cord of rats submitted to repeated restraint stress. *Neurochemistry Research* 2003; 28(9): 1315-20.
29. Thompson PA, Buckley PF, Meltzer HY. The brief psychiatric rating scale: effect of scaling system on clinical response assessment. *Journal of Clinical Psychopharmacology* 1994; 14:344-6.
 30. Wiesmann M, Wandinger KP, Missler U, Eckhoff D, Rothermundt M, Arolt V, Kirchner H. Elevated plasma levels of S-100b protein in schizophrenic patients. *Biological Psychiatry* 1999; 45: 1508-1511.
 31. Wills ED. Mechanism of lipid peroxide formation in animal tissues. *Biochemistry Journal* 1966; 99(5): 667-676.
 32. Yao JK, Reddy R, Mcelhinny LG, Van Kammen DP. Effects of haloperidol on antioxidant defense system enzymes in schizophrenia. *Journal of Psychiatric Research* 1998; 32(6): 385-91.
 33. Zhang XY, Zhou DF, Cao LY, Zhang PY, Wu GY. Elevated blood superoxide dismutase in neuroleptic-free schizophrenia: association with positive symptoms. *Journal of Psychiatric Research* 2003a; 117(1): 85-8.
 34. Zhang XY, Zhou DF, Cao LY, Zhang PY, Wu GY, Shen YC. The effect of risperidone treatment on superoxide dismutase in schizophrenia. *Journal of Clinical Psychopharmacology* 2003b; 23(2): 128-31.

Tabela 1
Níveis séricos de SOD e TBARS entre formas de esquizofrenia do DSM-IV

Formas de Esquizofrenia	N	SOD (USOD/g)	P	TBARS (nmol/ml)	P
Paranóide	51	9,5771±4,8258	0,210	5,0178±1,5710	0,980
Desorganizada	31	9,3245±4,3003		4,9490±1,3044	
Indiferenciada	6	12,8467±1,3050		5,0200±2,2759	
Total	88	9,7110±4,5388		4,9937±1,5179	

Média ± D.P.

Tabela 2
Níveis séricos de SOD e TBARS nos três grupos de curso clínico

Curso Clínico	N	SOD (USOD/g)	P	TBARS (nmol/ml)	P
Remissão Parcial	22	10,3323±4,7738	0,636	4,7900±1,4767	0,070
Sintomas Marcados	28	9,9011±4,5802		5,5361±1,7979	
Deteriorado	38	9,2113±4,4366		4,7121±1,2216	
Total	88	9,7110±4,5388		4,9937±1,5179	

Média ± D.P.

Tabela 3
Níveis séricos de SOD e TBARS entre formas de esquizofrenia do DSM-IV em pacientes do sexo feminino

Formas de Esquizofrenia	N	SOD (USOD/g)	P	TBARS (nmol/ml)	P
Paranóide	13	8,9900±3,9790	0,365	4,6377±0,8743	0,837
Desorganizada	4	9,1350±6,2411		4,9600±1,4112	
Indiferenciada	3	12,9500±1,6553		4,6233±0,7081	
Total	20	9,7399±4,6366		4,7000±0,9315	

Média ± D.P.

Tabela 4
Níveis séricos de SOD e TBARS em pacientes esquizofrênicos femininos nos três grupos de curso clínico

Curso Clínico	N	SOD (USOD/g)	P	TBARS (nmol/ml)	P
Remissão Parcial	4	10,2500±5,5388	0,929	4,4625±0,6690	0,854
Sintomas Marcados	9	9,6755±3,9857		4,7911±0,9166	
Deteriorado	7	9,1685±4,6461		4,7185±1,1633	
Total	20	9,6130±4,3023		4,7000±0,9315	

Média ± D.P.

Tabela 5
Níveis séricos de SOD e TBARS entre formas de esquizofrenia do DSM-IV em pacientes do sexo masculino

Formas de Esquizofrenia	N	SOD (USOD/g)	P	TBARS (nmol/ml)	P
Paranóide	38	9,7779±5,1160	0,491	5,1479±1,7376	0,837
Desorganizada	27	9,3526±4,1034		4,9474±1,3166	
Indiferenciada	3	12,7433±1,2190		5,4167±3,4606	
Total	68	9,7399±4,6366		5,0801±1,6469	

Média ± D.P.

Tabela 6
Níveis séricos de SOD e TBARS em pacientes esquizofrênicos masculinos nos três grupos de curso clínico

Curso Clínico	N	SOD (USOD/g)	P	TBARS (nmol/ml)	P
Remissão Parcial	18	10,3506±4,7682	0,689	4,8628±1,6075	0,037*
Sintomas Marcados	19	10,0079±4,9366		5,8889±2,0166 ^{&}	
Deteriorado	31	9,2210±4,4675		4,7106±1,2529 ^{&}	
Total	68	9,7399±4,6366		5,0801±1,6469	

Média ± D.P.

*ANOVA

[&]P=0.035 (teste de Tukey) para média dos níveis de TBARS entre os grupos com *Sintomas Marcados* e *Deteriorados*

11. ANEXOS

11.1 - Opcrit

11.1.1 - Descrição de critérios de pontuação

ESTUDO DE BASES MOLECULARES DA ESQUIZOFRENIA EM POPULAÇÃO PORTUGUESA E BRASILEIRA: OPCRIT DESCRIÇÃO DE CRITÉRIOS DE PONTUAÇÃO

McGuffin et al., 1991; Craddock et al., 1996; Azevedo et al., 1999 UWCM/ Tradução: Serviço de Psicologia Médica, Faculdade de Medicina, Coimbra/ Revisão Programa de Esquizofrenia do HCPA/ Programa de Pós-Graduação em Psiquiatria da UFRGS

1. Fonte de Avaliação

- 1 = Registros/ Processos clínicos hospitalares
- 2 = Entrevista estruturada (efetuada) com o indivíduo
- 3 = Sumário preparado
- 4 = Entrevista com o informante
- 5 = Combinação de fontes incluindo entrevista estruturada
- 6 = Combinação de fontes excluindo entrevista estruturada

2. Período de Tempo

- 1 = Atual/ Presente ou o episódio mais recente
- 2 = Episódio mais grave que teve
- 3 = Ocorrência toda vida de sintomas e sinais
- 4 = Outro episódio especificado ou período de tempo

3. Código do Sexo 0 = Masculino 1 = Feminino

4. Idade de Início Isto deve ser dado até ao ano mais próximo e define-se como a idade mais precoce com que procurou ajuda médica por razões psiquiátricas ou com que os sintomas começaram a causar tensão subjetiva ou prejuízo no funcionamento (registrar idade em anos, ex. 35).

5. Modo de Início

- 1 = Início súbito definido dentro de horas ou dias
 - 2 = Início agudo definido dentro de uma semana
 - 3 = Início moderadamente agudo definido dentro de 1 mês
 - 4 = Início gradual durante um período de até 6 meses
 - 5 = Início insidioso durante um período maior que 6 meses
- Cotar por cima (com pontuação mais baixa) se em dúvida

6. Solteiro O indivíduo nunca casou ou (nunca) viveu como se estivesse casado

- 0 = Casado 1 = Solteiro

7. Desempregado O indivíduo não estava empregado no início como definido acima (item 4). Mulheres que trabalham o dia todo em casa são cotadas como empregadas. Estudantes que frequentam aulas em período integral de um curso são cotados como empregados.

- 0 = Empregado 1 = Desempregado

8. Duração da doença em semanas (máximo 99)

A duração total da doença inclui incapacidades prodrômicas e residuais assim como a fase ativa da doença. No distúrbio psicótico, sintomas da fase prodrômica/residual são cotados como 2 dos seguintes antes ou depois do episódio ativo: Isolamento social/ prejuízo social/ comportamento marcadamente peculiar/diferente/ marcado prejuízo na higiene pessoal/ afeto embotado, superficial ou inapropriado/ discurso digressivo, vago, hiper-elaborado/ ideiação estranha ou bizarra/ vivências perceptivas fora do normal.

9. Mal ajustamento pré-mórbido ao trabalho

REFERE-SE À HISTÓRIA DE TRABALHO ANTES DO INÍCIO DA DOENÇA. DEVE SER COTADO (COMO = 1) SE O DOENTE TIVER SIDO INCAPAZ DE MANTER QUALQUER TRABALHO DURANTE MAIS QUE 6 MESES, TIVER UMA HISTÓRIA DE MUDANÇAS FREQUENTES DE EMPREGO OU TIVER SIDO SOMENTE CAPAZ DE AGUENTAR UM TRABALHO BEM ABAIXO DO ESPERADO PELO SEU NÍVEL EDUCACIONAL NA ÉPOCA DO PRIMEIRO CONTATO PSIQUIÁTRICO. TAMBÉM COTAR POSITIVAMENTE UM PADRÃO DE TRABALHO DOMÉSTICO (DONAS DE CASA) PERSISTENTEMENTE MUITO MAL E INSUCESSO EM ACOMPANHAR OS ESTUDOS.

- 0 = bom ajustamento pré-mórbido 1 = mal ajustamento pré-mórbido

10. Mal ajustamento social pré-mórbido

O DOENTE ACHAVA DIFÍCIL INICIAR OU MANTER RELAÇÕES NORMAIS, MOSTRAVA PERSISTENTE ISOLAMENTO SOCIAL, ENSIMESMADO OU MANTINHA INTERESSES SOLITÁRIOS ANTES DOS SINTOMAS PSICÓTICOS.

- 0 = BOM AJUSTAMENTO 1 = MAL AJUSTAMENTO

11. Distúrbio de personalidade pré-mórbido

Evidência de distúrbio de personalidade inadequada/ esquizóide/ esquizotípica/ paranóide/ ciclotímica/ psicopática/ sociopática presente desde a adolescência e anterior ao início dos sintomas psicóticos.

- 0 = ausente 1 = presente

12. Abuso de álcool/ drogas dentro de um ano do início de sintomas psicóticos

Abuso de álcool: Quando a quantidade é excessiva (julgamento do avaliador) quando ocorrem complicações relacionadas com o álcool, durante o ano anterior ao primeiro contato psiquiátrico (deve ser avaliado rigorosamente pois é critério de exclusão para algumas definições de esquizofrenia).

- 0 = ausente 1 = presente

Abuso de drogas: Quando drogas não prescritas são repetidamente tomadas ou drogas prescritas são usadas em quantidades excessivas e sem supervisão médica no ano anterior ao primeiro contato psiquiátrico.

- 0 = ausente 1 = presente

13. História familiar da esquizofrenia

CLARA HISTÓRIA DE ESQUIZOFRENIA EM PARENTES DE PRIMEIRO OU SEGUNDO GRAU.

- 0 = não 1 = sim

14. História familiar de outra doença psiquiátrica Parentes em primeiro ou segundo grau têm outra doença psiquiátrica suficientemente grave para justificar encaminhamento psiquiátrico.

0 = não 1 = sim

15. Doença cerebral estrutural anterior ao início: Há evidência pelo exame físico e/ou investigações especiais de doença física que pode explicar todos ou a maioria dos sintomas mentais. Isto pode incluir uma lesão cerebral clara (ou lesões), marcada perturbação metabólica, ou estado induzido por drogas que se sabe causar perturbação psicótica, confusão ou alteração do grau de consciência. Anomalias não específicas (ex. alargamento dos ventrículos no TCC) não devem ser incluídas.

0 = ausente 1 = presente

16. Claro estressor psicossocial anterior ao início Ocorreu um acontecimento ameaçador grave ou moderadamente grave antes do início do distúrbio que é improvável ser resultado do próprio comportamento do indivíduo (isto é, o acontecimento pode ser visto como independente ou incontrolável).

0 = ausente 1 = presente

17. Comportamento bizarro Comportamento que é estranho e incompreensível aos outros. Inclui comportamento que pode ser interpretado como uma resposta a alucinações auditivas ou interferência com o pensamento.

0 = ausente 1 = presente

***18. Catatonia:** O doente exhibe persistentes maneirismos, estereotípias, posturas, catalepsia, aderência automática às instruções, estupor ou excitação que não são explicáveis por alterações afetivas.

0 = ausente

7 = se presente durante pelo menos uma porção significativa de tempo durante um período de 1 mês (menos se tratado com êxito)

1 = se presente durante qualquer outra duração ou se a duração é desconhecida

***19. Atividade excessiva** O doente está marcadamente hiperativo. Isto inclui atividade motora, social e sexual. Cotar::

8 = se a hiperatividade durar pelo menos 2 dias

9 = para uma duração de pelo menos 4 dias

1 = para uma duração de pelo menos 1 semana

2 = para duração de pelo menos 2 semanas

***20. Atividade perigosa:** O doente está excessivamente envolvido em atividades com elevado potencial de consequências dolorosas, que não é reconhecido, ex. gastos excessivos, indiscrições sexuais, condução perigosa, etc. Cotar:

8 = para uma duração de pelo menos 2 dias 9 = para uma duração de pelo menos 4 dias

2 = duração de pelo menos 2 semanas 1 = duração de pelo menos 1 semana

***21. Distratibilidade:** O doente vivencia dificuldades de concentração no que se passa a sua volta porque a atenção é muito facilmente desviada para fatores irrelevantes ou externos.

8 = duração de pelo menos 2 dias

9 = duração de pelo menos 4 dias

2 = pelo menos 2 semanas

1 = pelo menos 1 semana

***22. Necessidade de sono reduzida** O doente dorme menos mas não se queixa de insônia. O tempo extra acordado é habitualmente ocupado com atividades excessivas.

8 = duração de pelo menos 2 dias

9 = duração de pelo menos 4 dias

1 = pelo menos 1 semana

2 = pelo menos 2 semanas

23. Atividade agitada O doente mostra atividade excessiva, tal como excitação motora, torcer as mãos, andar de um lado para o outro, tudo habitualmente acompanhado por uma expressão de angústia mental.

1 = se presente por pelo menos 1 semana

2 = se presente pelo menos 2 semanas

3 = se presente pelo menos 1 mês

24. Atividade lentificada O doente se queixa que se sente lentificado e incapaz de se mexer. Outros podem descrever sentimentos subjetivos de retardamento que podem ser notados pelo clínico que o examina.

1 = se presente pelo menos 1 semana

2 = pelo menos 2 semanas

3 = pelo menos 1 mês

25. Perda de energia/cansaço Queixa subjetiva de se sentir excessivamente cansado e sem energia.

1 = se presente pelo menos 1 semana

2 = pelo menos 2 semanas

3 = pelo menos 1 mês

26. Discurso difícil de entender Discurso que torna a comunicação difícil por causa da falta de organização lógica ou organização compreensível. Não inclui disartria ou dificuldade em falar.

0 = ausente 1 = presente

***27. Incoerência** A construção gramatical normal das frases rompeu-se. Inclui “salada de palavras” e deve ser cotada somente conservadoramente para formas extremas de distúrbio formal do pensamento.

0 = ausente

7 = se presente durante uma porção significativa de tempo no período de 1 mês (menos se tratado com êxito)

1 = presente durante qualquer outra duração ou a duração não está especificada

***28. Distúrbio formal do pensamento positivo** O doente tem um discurso fluente mas tende a se comunicar mal devido a neologismos, uso bizarro de palavras, descarrilamento, perda da associação.

0 = ausente

7 = se presente durante uma porção significativa de tempo no período de 1 mês (menos se tratado com êxito)

1 = presente durante qualquer outra duração ou duração inespecífica

29. Distúrbio formal do pensamento negativo: Inclui pobreza do pensamento, frequente bloqueio do pensamento, pobreza do discurso ou pobreza do conteúdo do discurso.

0 = ausente 1 = presente

***30. Pressão do discurso:** O doente está muito mais falador do que o habitual ou sente-se sob pressão para continuar a falar. Inclui distúrbio formal do pensamento tipo maníaco com associações por sons, jogos de palavras ou rimas.

8 = duração de pelo menos 2 dias

9 = duração de pelo menos 4 dias

1 = pelo menos 1 semana

2 = pelo menos 2 semanas

***31. Pensamentos acelerados** O doente vivencia os pensamentos que ocorrem em sua cabeça ou os outros observam fuga de idéias e acham difícil seguir o que o doente está dizendo, ou interromper por causa da rapidez e quantidade do discurso.

8 = duração de pelo menos 2 dias

9 = pelo menos 4 dias

1 = pelo menos 1 semana

2 = pelo menos 2 semanas

***32. Restrição do afeto** As respostas emocionais do doente são limitadas em amplitude e na entrevista há uma impressão de indiferença maliciosa ou de “falta de contato”.

0 = ausente

7 = presente durante uma porção significativa de tempo no período de 1 mês (menos se tratado com êxito)

1 = presente durante qualquer outra duração ou duração inespecífica

***33. Embotamento afetivo** As respostas emocionais do doente são persistentemente sem grande profundidade e mostram uma completa falência em ressoar a mudança exterior. (NB, Diferenças entre Restrição e Embotamento do afeto devem ser consideradas de grau, com embotamento sendo somente cotado em casos extremos.

0 = ausente

7 = presente durante uma porção significativa de tempo no período de 1 mês (menos se tratado com êxito)

1 = presente durante qualquer outra duração ou duração inespecífica

***34. Afeto inapropriado** As respostas emocionais do doente são inapropriadas às circunstâncias, por ex. rir enquanto discute-se ocorrências dolorosas ou tristes, risinhos tolos sem razão aparente.

0 = ausente

7 = presente durante uma porção significativa de tempo pelo menos 1 mês (menos se tratado com êxito)

1 = presente durante qualquer outra duração ou duração inespecífica

***35. Elevação do humor** O humor predominante do doente é de euforia.

8 = duração de pelo menos 2 dias

9 = duração de pelo menos 4 dias

1 = pelo menos 1 semana

2 = pelo menos 2 semanas

Se a euforia durou menos de uma semana mas o doente foi hospitalizado por doença afetiva cotar “1”.

***36. Humor irritável** O humor do doente é predominantemente irritável.

8 = duração de pelo menos 2 dias

9 = pelo menos 4 dias

1 = pelo menos 1 semana

2 = pelo menos 2 semanas

Se a irritação durou menos de uma semana mas o doente foi hospitalizado por doença afetiva cotar “1”.

37. Disforia Humor persistentemente deprimido ou “pra baixo”, humor irritável e triste ou perda difusa do interesse.

1 = presente durante pelo menos 1 semana

2 = pelo menos 2 semanas

3 = pelo menos 1 mês

38. Variação diurna (humor pior de manhã) Disforia/ humor “pra baixo” e/ou sintomas depressivos associados são piores logo após o acordar com alguma melhoria (mesmo se somente ligeira) a medida que o dia passa.

0 = ausente

1 = presente

39. Perda de prazer Incapacidade difusa de ter prazer em qualquer atividade. Inclui marcada perda de interesse ou perda da libido.

1 = duração de pelo menos 1 semana

2 = pelo menos 2 semanas

3 = pelo menos 1 mês

***40. Diminuição da libido** Redução clara e persistente do interesse ou impulso sexual em comparação com o nível antes do início da doença.

0 = ausente

9 = duração de pelo menos 4 dias

1 = pelo menos 1 semana

41. Dificuldade de concentração Queixa subjetiva de ser incapaz de pensar com clareza, tomar decisões, etc.

1 = duração de pelo menos 1 semana

2 = pelo menos 2 semanas

3 = pelo menos 1 mês

42. Excessiva auto-culpabilização Sentimentos extremos de culpa e desvalorização. Pode ser de intensidade delirante (“a pior pessoa do mundo”).

1 = duração de pelo menos 1 semana

2 = pelo menos 2 semanas

3 = pelo menos 1 mês

43. Ideação suicida Preocupação com pensamentos de morte (não necessariamente a própria). Pensa em suicídio, desejaria estar morto, tentativas de suicídio.

- 1 = duração de pelo menos 1 semana
- 2 = pelo menos 2 semanas
- 3 = pelo menos 1 mês

44. Insônia inicial O doente queixa-se de que é incapaz de começar a dormir, permanecendo pelo menos uma hora acordado.

- 1 = duração de pelo menos 1 semana
- 2 = pelo menos 2 semanas
- 3 = pelo menos 1 mês

Só se tiver informação sobre insônia cotar este item.

45. Insônia intermediária (sono fragmentado) Na maioria das noites o sono está perturbado, o doente acorda no meio do sono e tem dificuldade em voltar a adormecer.

- 0 = ausente 1 = presente

Só se tiver informação sobre insônia cotar este item.

46. Despertar precoce: O doente queixa-se que acorda persistentemente pelo menos uma hora mais cedo que a hora habitual de acordar.

- 1 = duração de pelo menos 1 semana
- 2 = pelo menos 2 semanas
- 3 = pelo menos 1 mês

47. Sonolência excessiva O doente queixa-se de dormir demasiado.

- 1 = duração de pelo menos 1 semana
- 2 = pelo menos 2 semanas
- 3 = pelo menos 1 mês

48. Diminuição do apetite O doente tem queixas subjetivas de diminuição do apetite. Não necessariamente observado comer menos.

- 1 = duração de pelo menos 1 semana
- 2 = pelo menos 2 semanas
- 3 = pelo menos 1 mês

49. Perda de peso

- 1 = perda de 500 gramas por semana durante várias semanas
 - 2 = perda de pelo menos 1 kg por semana durante várias sem
 - 3 = perda de pelo menos 5 kg durante o período de um ano
- Não cotar as perdas de peso consecutivas a dietas voluntárias para emagrecer.

50. Aumento do apetite O doente descreve aumento do apetite e/ou “comer reconfortante”.

- 1 = duração de pelo menos 1 semana
- 2 = pelo menos 2 semanas
- 3 = pelo menos 1 mês

51. Aumento de peso

- 1 = aumento de 500 gramas por semana durante várias sem
- 2 = aumento de pelo menos 1 kg por semana por várias sem
- 3 = aumento de pelo menos 5 kg durante o período de 1 ano

52. Relação sintomas psicóticos/ afetivos (item decisivo para diagnóstico, preencher com cuidado)

- 0 = sem / não co-ocorrência

1 = os sintomas psicóticos dominam o quadro clínico, embora possa ocorrer também perturbação afetiva ocasional

2 = os sintomas psicóticos e afetivos estão equilibrados com nenhum grupo de sintomas dominando o curso global da doença

3 = os sintomas afetivos predominam, embora possa também ocorrer sintomas psicóticos

4 = como na cotação “2” (ver acima) mais delírios ou alucinações durante pelo menos 2 semanas mas sem sintomas do humor proeminentes

***53. Aumento da sociabilidade (0-2)**

- 1 = excessiva familiaridade

2 = (duração de pelo menos 1 semana) para perda das inibições sociais que resultem em comportamento que é inadequado às circunstâncias e que não é próprio do seu caráter

9 = para um (excessiva familiaridade) ou outro (perda das inibições sociais) quando ocorrem durante pelo menos 4 dias mas menos que uma semana

54. Delírios persecutórios Inclui todos delírios com ideação persecutória

- 0 = ausente 1 = presente

Quando cotarem delírios por favor cotar cada um separadamente num e só numa categoria descrevendo o tipo específico de delírio (persecutório, grandioso, influência/referência, bizarro, passividade percepção delirante primária, outros delírios primários, roubo do pensamento, culpa, pobreza ou niilístico).

***55. Delírios bem sistematizados** A doença é caracterizada por uma série de delírios bem organizados ou bem sistematizados.

- 0 = ausente

7 = presente durante uma porção significativa de tempo no período de 1 mês (menos se tratado com êxito)

1 = presente durante qualquer outra duração ou duração inespecífica

***56. Aumento da autoestima** O doente acredita que é uma pessoa excepcional com poderes, planos, talentos ou capacidades especiais.

Cotar positivamente aqui se idéia sobrevalorizada, mas se a qualidade é delirante cotar também o item 57 (delírios de grandeza).

- 8 = duração de pelo menos 2 dias

9 = pelo menos 4 dias

1 = pelo menos 1 semana

2 = pelo menos 2 semanas

***57. Delírio de grandeza** O doente tem um exagerado sentimento da sua importância, tem poderes ou capacidades excepcionais ou acredita que é rico ou famoso, nobre ou parente de pessoas importantes. Inclui também delírios de identificação com Deus, anjos, o Messias, etc. (ver também item 56).

8 = duração de pelo menos 2 dias

9 = pelo menos 4 dias

1 = pelo menos 1 semana

2 = pelo menos 2 semanas

7 = presente pelo menos uma porção significativa de tempo no período de 1 mês (menos se tratado com êxito).

***58. Delírio de influência** Os acontecimentos, objetos ou pessoas do ambiente circundante do doente têm um significado especial, frequentemente de natureza persecutória. Inclui idéias de referência provenientes da televisão, rádio ou jornais, sendo que o doente acredita que estes órgãos de informação fornecem instruções ou prescrevem certos comportamentos.

0 = ausente

7 = presente durante uma porção significativa de tempo no período de 1 mês (menos se tratado com êxito)

1 = presente durante qualquer outra duração ou duração inespecífica

***59. Delírios bizarros**

Delírios estranhos, absurdos ou fantásticos cujo conteúdo pode ter uma qualidade mística, mágica ou de ficção científica.

0 = ausente

7 = presente durante uma porção significativa de tempo no período de 1 mês (menos se tratado com êxito)

1 = presente durante qualquer duração ou duração não está especificada

***60. Delírios espalhados** Delírios que se alastram à maioria dos aspectos da vida do doente e/ou preocupam-no durante a maior parte do tempo.

0 = ausente

7 = presente por uma porção significativa de tempo no período de 1 mês (menos se tratado com êxito)

1 = presente durante qualquer outra duração ou duração inespecífica

Este item deve ser cotado em adição à cotação dos tipos de delírios descritos.

***61. Delírios de passividade** Inclui todas as sensações, emoções ou ações fabricadas. Inclui todas vivências de influência em que o doente sabe que seus impulsos, sentimentos, atos ou sensações somáticas são controlados ou impostos por um agente externo.

0 = ausente

7 = presente durante uma porção significativa de tempo no período de 1 mês (menos se tratado com êxito)

1 = presente durante qualquer outra duração ou duração inespecífica

***62. Percepção delirante primária** O doente percebe alguma coisa no ambiente externo que desencadeia uma crença especial, relativamente significativa, incompreensível da qual está certo e que de algum modo está vagamente ligada com a percepção desencadeante.

0 = ausente

7 = presente durante uma porção significativa de tempo no período de 1 mês (menos se tratado com êxito)

1 = presente durante qualquer outra duração ou duração inespecífica

***63. Outros delírios primários** Inclui humor delirante e idéias delirantes. O humor delirante é um humor estranho em que o ambiente parece mudado de uma forma ameaçadora, mas o significado da mudança não pode ser compreendido pelo doente, que geralmente está tenso, ansioso ou baralhado. Pode levar a uma crença delirante. Uma idéia delirante surge subitamente na mente do doente completamente formada e não anunciada por quaisquer pensamentos relacionados.

0 = ausente

7 = presente durante uma porção significativa de tempo no período de 1 mês (menos se tratado com êxito)

1 = presente durante qualquer outra duração ou duração inespecífica

***64. Delírios e alucinações que duram uma semana** Qualquer tipo de delírio acompanhado por qualquer tipo de alucinação durante uma semana.

0 = ausente

7 = presente durante uma porção significativa de tempo no período de 1 mês (menos se tratado com êxito)

1 = presente durante qualquer outra duração ou duração inespecífica

Este item deve ser cotado em adição à cotação dos tipos de delírios descritos.

***65. Alucinações e delírios persecutórios/ciúme** Isto se explica por si mesmo. Notar que as crenças anormais são de intensidade e qualidade delirante e são acompanhadas de alucinações verdadeiras.

0 = ausente

7 = presente durante uma porção significativa de tempo no período de 1 mês (menos se tratado com êxito)

1 = presente durante qualquer outra duração ou duração não está especificada

Este item deve ser cotado em adição à cotação dos tipos de delírios descritos.

***66. Inserção do pensamento** O doente reconhece que os pensamentos estão sendo colocados na sua cabeça não sendo reconhecidos como seus e tendo sido provável ou claramente inseridos por um agente externo.

0 = ausente

7 = presente durante uma porção significativa de tempo no período de 1 mês (menos se tratado com êxito)

1 = presente durante qualquer outra duração ou duração inespecífica

***67. Roubo do pensamento** O doente vivencia paragem dos pensamentos na sua cabeça, o que pode ser interpretado como sendo os pensamentos retirados (ou roubados) por algum agente externo.

0 = ausente

7 = presente durante uma porção significativa de tempo no período de 1 mês (menos se tratado com êxito)

1 = presente durante qualquer outra duração ou duração não está especificada

***68. Difusão do pensamento** O doente vivencia difusão do pensamento para fora de sua cabeça de modo que podem ser compartilhados pelos outros ou até vividos por outros.

0 = ausente

7 = presente durante uma porção significativa de tempo no período de 1 mês (menos se tratado com êxito)

1 = presente durante qualquer outra duração ou duração não está especificada

69. Delírios de culpa Crença firme mantida pelo doente de ter cometido algum pecado, crime ou ter causado dano a outros apesar da inexistência de qualquer evidência objetiva em apoio dessa crença.

0 = ausente 1 = presente

70. Delírios de pobreza Crença firme mantida pelo paciente de ter perdido todo ou muito do seu dinheiro ou bens e tendo ficado pobre apesar da inexistência de qualquer evidência objetiva em apoio dessa crença.

0 = ausente 1 = presente

71. Delírios nilíísticos Crença firmemente mantida de que alguma parte do corpo do doente tenha desaparecido, apodrecido ou esteja afetado por alguma doença devastadora ou maligna apesar da inexistência de qualquer evidência objetiva em apoio dessa crença.

0 = ausente 1 = presente

72. Eco do pensamento Cotar 1 se o doente vivencia pensamentos repetidos ou ecoados na sua cabeça ou de uma voz fora de sua cabeça.

0 = ausente 1 = presente

***73. Alucinações auditivas na terceira pessoa** Duas ou mais vozes dialogando sobre o doente na terceira pessoa. Cotar se “verdadeiras” ou “pseudo” alucinações, isto é, a diferenciação da origem das vozes não é importante.

0 = ausente

7 = presente durante uma porção significativa de tempo no período de 1 mês (menos se tratado com êxito)

1 = presente durante qualquer outra duração ou duração não está especificada

***74. Vozes comentadoras das atividades** O doente ouve vozes que descrevem as suas ações, sensações ou emoções a medida que ocorrem. Cotar quer estas sejam possíveis “pseudo” alucinações ou claras alucinações (verdadeiras).

0 = ausente

7 = presente durante uma porção significativa de tempo no período de 1 mês (menos se tratado com êxito)

1 = presente durante qualquer outra duração ou duração não está especificada

***75. Vozes insultórias/ insultantes/acusatórias/ persecutórias** Vozes que falam para o doente de modo insultuoso, acusatório ou persecutório.

0 = ausente

7 = presente durante uma porção significativa de tempo no período de 1 mês (menos se tratado com êxito)

1 = presente durante qualquer outra duração ou duração não está especificada

***76. Outras alucinações auditivas (não-afetivas)** Qualquer outro tipo de alucinação auditiva. Inclui vozes agradáveis ou neutras e alucinações não verbais.

0 = ausente

7 = presente durante uma porção significativa de tempo no período de 1 mês (menos se tratado com êxito)

1 = presente durante qualquer outra duração ou duração não está especificada

***77. Alucinação não-afetiva de qualquer modalidade** Alucinações nas quais o conteúdo não tem relação aparente com elação ou depressão.

0 = ausente

7 = presente durante uma porção significativa de tempo no período de 1 mês (menos se tratado com êxito)

1 = presente durante qualquer outra duração ou duração não está especificada

78. Diagnóstico em toda a vida de abuso/ dependência de álcool Uso continuado apesar do conhecimento de ter um problema persistente ou recorrente social, ocupacional, psicológico ou físico que é causado ou exacerbado pelo uso de álcool; ou uso recorrente em situações nas quais é fisicamente prejudicial; ou sintomas claramente indicativos de dependência. Um dos supracitados deve ter ocorrido persistentemente durante pelo menos 1 mês; ou repetidamente durante um período mais longo.

0 = não 1 = sim

79. Diagnóstico em toda a vida de abuso/ dependência de cannabis Uso continuado apesar do conhecimento de ter um problema persistente ou recorrente social, ocupacional, psicológico ou físico que é causado ou exacerbado pelo uso de cannabis; ou uso recorrente em situações nas quais é fisicamente prejudicial; ou sintomas claramente indicativos de dependência. Um dos supracitados deve ter ocorrido persistentemente durante pelo menos 1 mês; ou repetidamente durante um período mais longo.

0 = não 1 = sim

80. Diagnóstico em toda a vida de abuso/dependência de outras substâncias Uso continuado apesar do conhecimento de ter um problema persistente ou recorrente social, ocupacional, psicológico ou físico que é causado ou exacerbado pelo uso de outras substâncias; ou uso recorrente em situações nas quais é fisicamente prejudicial; ou sintomas claramente indicativos de dependência. Um dos supracitados deve ter ocorrido persistentemente durante pelo menos 1 mês; ou repetidamente durante um período mais longo.

0 = não 1 = sim

81. Abuso/dependência de álcool com psicopatologia Abuso ou dependência como definido no item 78 acompanhado por qualquer dos itens precedentes que descrevem psicopatologia.

0 = não 1 = sim

82. Abuso/dependência de cannabis com psicopatologia Abuso ou dependência como definido no item 79 acompanhado por qualquer dos itens precedentes que descrevem psicopatologia.

0 = não 1 = sim

83. Abuso/dependência de outras substâncias com psicopatologia Abuso ou dependência como definido no item 80 acompanhado por qualquer dos itens precedentes que descrevem psicopatologia.

0 = não 1 = sim

84. Informação não credível O doente dá respostas enganadoras às questões ou fornece um relato salgado, incoerente ou inconsciente.

0 = não 1 = sim

85. Ausência de insight O doente é incapaz de reconhecer que as suas vivências são anormais ou que são produto de processos mentais anômalos, ou reconhece que as suas vivências são anormais, mas dá uma explicação delirante.

1 = ausência de insight 0 = presença de insight

86. Contato difícil O entrevistador tem dificuldade em estabelecer contato com o doente, que parece distante ou alheio. Não incluir doentes que são difíceis de entrevistar devido à hostilidade ou irritabilidade.

0 = não 1 = sim

87. Prejuízo/incapacidade durante o distúrbio

0 = sem prejuízo

1 = prejuízo subjetivo no trabalho, escola ou funcionamento social

2 = prejuízo no papel mais importante da vida com clara redução na produtividade e/ou foi criticado por isso

3 = não funciona nada no papel mais importante da vida durante mais de 2 dias ou foi requerida a internação, ou ocorreram sintomas psicóticos ativos, tais como delírios ou alucinações

88. Deterioração do nível de funcionamento pré-mórbido O doente não recupera o nível de funcionamento social, ocupacional ou emocional pré-mórbido, após um episódio agudo da doença.

0 = ausente 1 = presente

89. Os sintomas psicóticos respondem aos neurolépticos Avaliar globalmente o período total. Cotar positivamente se a doença parece responder a qualquer tipo de neuroléptico (depot ou oral), ou se ocorre recaída quando a medicação é suspensa.

0 = não 1 = sim

90. Curso da doença

1 = Episódio único com boa recuperação

4 = Doença crônica contínua

2 = Episódios múltiplos com boa recuperação entre eles

5 = Doença crônica contínua com deterioração

3 = Episódios múltiplos com recuperação parcial entre eles

Cotar este item em sentido hierárquico, ex. se o curso do doente no passado foi cotado 2, mas no período de tempo agora considerado for cotado 4, então a cotação correta é 4.

11.1.2 - Informações

**BASES MOLECULARES DA ESQUIZOFRENIA EM POPULAÇÃO PORTUGUESA E
BRASILEIRA
AA. INFORMAÇÃO DO OPCRIT VERSÃO 3.4**

© McGuffin et al., 1991; Craddock et al., 1996; Azevedo et al., 1999 UWCM/ Tradução: Serviço de Psicologia Médica, Faculdade de Medicina, Coimbra/Adaptação DIGS/OPCRIT: Antonio Macedo & Paulo Belmonte de Abreu

NOME: Número Pesq. HCPA

DATA .../.../...

R	N	IDENTIFICAÇÃO
	01	Fonte de avaliação
	02	Período de tempo
	03	Código do sexo
	04	Idade de início (anos)
	05	Modo de início
	06	Solteiro
	07	Desempregado
	08	Duração da doença em semanas (máx.99)
	09	Mau ajustamento pré-mórbido ao trabalho
	10	Mau ajustamento social pre-mórbido
	11	Distúrbio pré-mórbido de personalidade
	12	Abuso de álcool / drogas dentro de um ano de início
	13	História familiar de esquizofrenia
	14	História familiar de outra doença psiquiátrica
	15	Doença cerebral estrutural anterior ao início
	16	Claro estressor psicossocial anterior ao início
		APARÊNCIA E COMPORTAMENTO
	17	Comportamento bizarro
	18	Catatonia
	19	Atividade excessiva
	20	Atividade perigosa
	21	Distratibilidade
	22	Necessidade de sono reduzida
	23	Atividade agitada
	24	Atividade lentificada
	25	Perda de energia / cansaço
		DISCURSO E FORMA DO PENSAMENTO
	26	Discurso difícil de entender
	27	Incoerência
	28	Discurso formal do pensamento positivo
	29	Discurso formal do pensamento negativo
	30	Pressão do discurso
	31	Pensamentos acelerados
		AFETO E ASPECTOS ASSOCIADOS :
	32	Restrição do afeto
	33	Embotamento afetivo
	34	Afeto inapropriado
	35	Elevação do humor
	36	Humor irritável
	37	Disforia
	38	Variação diurna (humor pior de manhã)
	39	Perda do prazer
	40	Diminuição da libido
	41	Dificuldade de concentração
	42	Excessiva auto-culpabilização
	43	Ideação suicida
	44	Insônia inicial
	45	Insônia intermediária (sono fragmentado)
	46	Acordar precoce
	47	Sonolência excessiva
	48	Diminuição do apetite
	49	Perda de peso
	50	Aumento do apetite

51	Aumento de peso
52	Relação entre sintomas psicóticos e afetivos
53	Aumento da sociabilidade
	CRENÇAS E IDÉIAS ANORMAIS
54	Delírios persecutórios
55	Delírios bem sistematizados
56	Aumento da auto-estima
57	Delírio de grandeza
58	Delírio de influência
59	Delírios bizarros
60	Delírios espalhados
61	Delírios de passividade
62	Percepção delirante primária
63	Outros delírios primários
64	Delírios/alucinações que duram 1 sem
65	Alucinações/delírios persecutórios/ciúme
66	Inserção de pensamento
67	Roubo de pensamento
68	Difusão de pensamento
69	Delírios de culpa
70	Delírios de pobreza
71	Delírios nihilísticos
	PERCEPÇÕES ANORMAIS
72	Eco do pensamento
73	Alucinações auditivas na Terceira pessoa
74	Vozes comentadoras da atividade
75	Vozes insultuosas/acusatórias/persecutórias
76	Outras alucinações auditivas (não-afetivas)
77	Alucinação não-afetiva de qualquer modalidade (não-congruentes c/ humor)
	ABUSO DE SUBSTÂNCIAS OU DEPENDÊNCIA
78	Diagnóstico em toda vida de abuso/depde álcool
79	Diagnóstico em toda vida de abuso/dep. cannabis
80	Diagnóstico em toda vida abuso/dep. de outras substâncias
81	Abuso/dependência de álcool com psicopatologia
82	Abuso/dependência de cannabis com psicopatologia
83	Abuso/dep. de outras substâncias com psicopatologia
	APRECIÇÃO GERAL
84	Informação não credível
85	Ausência de insight
86	Contato difícil .
87	Prejuízo/incapacidade durante o distúrbio
88	Deterioração do nível de funcionamento pré-mórbido
89	Os sintomas psicóticos respondem aos neurolépticos .
90	Curso da doença

11.2 - Escala BPRS (Brief Psychiatric Rating Scale)

Thompson et al., 1994

Código: 1) ausente 2) muito discreto 3) discreto 4) moderado 5) moderadamente grave 6) grave 7) extremamente grave

1. Preocupações somáticas	
2. Ansiedade	
3. Retraimento afetivo	
4. Desorganização Conceitual	
5. Sentimento de culpa	
6. Tensão	
7. Maneirismo e Atitude	
8. Megalomania	
9. Humor depressivo	
10. Hostilidade	
11. Desconfiança	
12. Comportamento alucinatório	
13. Retardamento motor	
14. Não cooperação	
15. Pensamentos não habituais	
16. Embotamento afetivo	
17. Excitação	
18. Desorientação	
SCORE TOTAL	

11.3 - Consentimento Informado

11.3.1 - Termo de Consentimento Informado para Pacientes

Número do estudo:

Nome do sujeito:

Data de nascimento:

Cód. de identidade do sujeito:

Médico supervisor:

Informações sobre o estudo ao paciente

Esta folha informativa tem o objetivo de fornecer a informação mínima para quem considerar participar neste estudo. Ela não elimina a necessidade do pesquisador de explicar, e se necessário, ampliar as informações nela contidas.

Antes de participar deste estudo, gostaríamos que você tomasse conhecimento do que ele envolve. Damos abaixo alguns esclarecimentos sobre dúvidas que você possa ter. Em caso de qualquer dúvida quanto ao estudo, o que ele envolve e sobre os seus direitos, você deverá contatar a Dra Clarissa Severino Gama pelo telefone (51) 99885851.

Qual é o objetivo da pesquisa?

Com este estudo buscamos identificar se há relação entre a quantidade algumas substâncias no sangue e a esquizofrenia. Caso haja esta relação, estas substâncias poderão ser úteis para ajudar no entendimento e tratamento da doença.

Quais são os riscos em participar?

O único risco a que o paciente será submetido é o da punção venosa, que é um procedimento corriqueiro e de baixíssimo risco. Serão retirados 5 ml de sangue, o que não compromete a saúde do paciente. O procedimento será feito com material esterilizado e descartável por profissionais da área de saúde com competência técnica para tal.

Itens importantes

Você tem a liberdade de desistir do estudo a qualquer momento, sem fornecer um motivo, assim como pedir maiores informações sobre o estudo e o procedimento a ser feito.

O que eu ganho com este estudo?

Sua colaboração neste estudo visa aumentar o conhecimento científico sobre a esquizofrenia. Em curto e médio prazos, não haverá ganhos específicos para o paciente ao participar deste estudo.

Quais são os meus direitos?

Os pesquisadores do Serviço de Psiquiatria e os representantes da Comissão de Ética do HCPA podem necessitar examinar os seus registros a fim de verificar as informações para o objetivo deste estudo. No entanto, os seus registros médicos serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados deste estudo poderão ser publicados em um jornal científico, mas você não será identificado por nome. Sua participação neste estudo é voluntária, de forma que caso você decida não participar, isso não afetará o tratamento normal ao qual você tem direito.

DECLARAÇÃO:

Eu,.....declaro que:

1. Concordo total e voluntariamente em fazer parte deste estudo.
2. Recebi uma explicação completa do objetivo do estudo, dos procedimentos envolvidos e o que se espera de mim. O médico me explicou os possíveis problemas que podem surgir em consequência da minha participação neste estudo.
3. Informe-me o médico sobre medicamentos que estou tomando.
4. Concordo em cooperar inteiramente com o médico supervisor.
5. Estou ciente de que tenho total liberdade de desistir do estudo a qualquer momento e que esta desistência não irá, de forma alguma, afetar meu tratamento ou administração médica futura.
6. Estou ciente de que a informação nos meus registros médicos é essencial para a avaliação dos resultados do estudo. Concordo em liberar esta informação sob o entendimento de que ela será tratada confidencialmente.
7. Estou ciente de que não serei referido por nome em qualquer relatório relacionado a este estudo. Da minha parte, não devo restringir, de forma alguma, os resultados que possam surgir neste estudo.

Assinatura do Paciente

Ass: _____

Data:

Assinatura do Pesquisador Responsável:

Ass: _____

Data:

Assinatura do Familiar Responsável pelo Paciente

Ass: _____

Data:

11.3.2 - Termo de consentimento informado para voluntários saudáveis

Número do estudo:
Data de nascimento:
Médico supervisor:

Nome do sujeito:
Cód. de identidade do sujeito:

Informações sobre o estudo ao voluntário do grupo controle

Esta folha informativa tem o objetivo de fornecer a informação mínima para o sujeito que considere participar neste estudo. Ela não elimina a necessidade do pesquisador de explicar, e se necessário, ampliar as informações nela contidas. Antes de participar deste estudo, gostaríamos que você tomasse conhecimento do que ele envolve. Damos abaixo alguns esclarecimentos sobre dúvidas que você possa ter. Em caso de qualquer dúvida quanto ao estudo e o que ele envolve e sobre os seus direitos, você deverá contatar a Dra. Clarissa Severino Gama pelo telefone (51)99885851.

Qual é o objetivo da pesquisa?

Com este estudo buscamos identificar se há relação entre a quantidade algumas substâncias no sangue e a esquizofrenia. Caso haja esta relação, estas substâncias poderão ser úteis para ajudar no entendimento e tratamento da doença.

Quais são os riscos em participar?

O único risco a que o paciente será submetido é o da punção venosa, que é um procedimento corriqueiro e de baixíssimo risco. Serão retirados 5 ml de sangue, o que não compromete a saúde do voluntário. O procedimento será feito com material esterilizado e descartável por profissionais da área de saúde com competência técnica para tal. O voluntário será submetido a um questionário e uma avaliação cognitiva para verificar se em algum momento de sua vida já sofreu algum transtorno mental grave, como esquizofrenia, transtornos de humor (como depressão), demência ou dependência de substâncias psicoativas.

Itens importantes

Você tem a liberdade de desistir do estudo a qualquer momento, sem fornecer um motivo, assim como pedir maiores informações sobre o estudo e o procedimento a ser feito. Caso seja constatada alguma patologia na avaliação cognitivo-psiquiátrica, este resultado lhe será informado e você será encaminhado para a triagem do ambulatório de psiquiatria do HCPA.

O que eu ganho com este estudo?

Sua colaboração neste estudo visa aumentar o conhecimento científico sobre a esquizofrenia. Em curto e médio prazos não haverá ganhos específicos pelo voluntário ao participar deste estudo.

Quais são os meus direitos?

Os resultados do teste cognitivo e das dosagens serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados deste estudo poderão ser publicados em um jornal científico, mas você não será identificado por nome. Sua participação neste estudo é voluntária, de forma que caso você decida não participar, não lhe acarretará problema algum.

DECLARAÇÃO:

Eu,declaro que:

1. Concordo total e voluntariamente em fazer parte deste estudo.
2. Recebi uma explicação completa do objetivo do estudo, dos procedimentos envolvidos e o que se espera de mim. O médico me explicou os possíveis problemas que podem surgir em consequência da minha participação neste estudo.
3. Informei o médico sobre todos os medicamentos que tomei nas últimas 24 horas e medicamentos que ainda estou tomando.
4. Concordo em cooperar inteiramente com o médico supervisor.
5. Estou ciente de que tenho total liberdade de desistir do estudo a qualquer momento e que esta desistência não irá, de forma alguma, acarretar qualquer tipo de problema para mim.
6. Estou ciente de que a informação colhida no questionário é essencial para a avaliação dos resultados do estudo. Concordo em liberar esta informação sob o entendimento de que ela será tratada confidencialmente.
7. Estou ciente de que não serei referido por nome em qualquer relatório relacionado a este estudo. Da minha parte, não devo restringir, de forma alguma, os resultados que possam surgir neste estudo.

Assinatura do Voluntário

Assinatura do Pesquisador Responsável:

Ass: _____

Ass: _____

Data:

Data: