

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
Instituto de Ciências Biológicas  
Programa de Pós Graduação em Neurociências

Vívian Thaise da Silveira Anício

**Avaliação do padrão de produção de mediadores inflamatórios após modulação da via PI3K/GSK3/mTOR em células mononucleares do sangue periférico de pacientes com esquizofrenia estáveis clinicamente**

Belo Horizonte  
Junho de 2019

Vívian Thaise da Silveira Anício

**Avaliação do padrão de produção de mediadores inflamatórios após modulação da via PI3K/GSK3/mTOR em células mononucleares do sangue periférico de pacientes com esquizofrenia estáveis clinicamente**

Dissertação como requisito parcial, para obtenção de grau de Mestre em Neurociências, apresentada ao programa de pós-graduação em Neurociências da Universidade Federal de Minas Gerais.

Orientador:

ANTÔNIO CARLOS PINHEIRO DE OLIVEIRA

Co-orientador:

JOÃO VINÍCIUS SALGADO

Belo Horizonte

Junho de 2019

043

Anício, Vívian Thaise da Silveira.

Papel da via PI3K/AKT/GSK3/mTOR em células mononucleares do sangue periférico de pacientes com esquizofrenia [manuscrito] / Vívian Thaise da Silveira Anício. - 2019.

160 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira. Co-Orientador: João Vinícius Salgado.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Neurociências.

1. Neurociências. 2. Esquizofrenia. 3. Mediadores da Inflamação. 4. Fosfatidilinositol 3-Quinase. 5. Proteína quinase B. 6. Quinase 3 da Glicogênio Sintase. 7. Alvo Mecanístico do Complexo 1 de Rapamicina. I. Oliveira, Antônio Carlos Pinheiro de. II. Salgado, João Vinicius. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 612.8



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

UFMG

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Avaliação do padrão de produção de mediadores inflamatórios após modulação da via PI3K/GSK3/mTOR em células mononucleares do sangue periférico de pacientes com esquizofrenia estáveis clinicamente.

### VIVIAN THAISE DA SILVEIRA ANICIO

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em NEUROCIÊNCIAS, como requisito para obtenção do grau de Mestre em NEUROCIÊNCIAS, área de concentração NEUROCIÊNCIAS BÁSICAS.

Aprovada em 17 de junho de 2019, pela banca constituída pelos membros:

Prof(a). Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira - Orientador  
UFMG

Prof(a). João Vinicius Salgado  
UFMG

Prof(a). Aline Silva de Miranda  
UFMG

Prof(a). Breno Fiuza Cruz  
HC UFMG

Belo Horizonte, 17 de junho de 2019.

## DEDICATÓRIA

Para aquele que me trouxe admiração a primeira vista  
e me mostrou com olhos vibrantes e sorrisos-barba  
os diferentes e delicados tons que podem habitar um ipê branco,  
segredos de liquidificador,  
e como se formam as conchas.

Para aquele que carrega o gosto macio, gentil e sensível de dizer palavras  
Pessoas-tempo,  
Saúde-doença,  
Causas-efeitos,  
Mortal(idade)  
Indica-dores.  
Afetos e reações nucleares.

Para aquele que me ensinou que a loucura e a ciência são coisas humanas,  
entidades levíssimas, onde moram as coisas do tempo.  
e que a espera(nça), aquela que realmente vale a pena,  
é a do verbo esperar.

Laços, nós, tempo e entre(nós)  
É que a temporalidade nem sempre é clara  
e o prefixo e o segundo elemento  
nem sempre se juntam no mesmo tempo verbal

·  
·  
·

Para Edson Perini

## **AGRADECIMENTO**

Há certas coisas do sentir que são tão reservadas, que é dificultoso colocá-las no papel. Mas, de qualquer forma, gostaria de agradecer a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho. Um agradecimento especial ao meu co-orientador João Víncius Salgado e ao meu querido orientador Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira por todo apoio e ensinamentos realizados de forma leve, instigadora, gentil e encantadora.

Gostaria de deixar a minha extrema gratidão à Ingrid Caroline pelo companheirismo, bom humor e sorrisos, e minha eterna, extrema e mais sincera admiração à Salvina Campos, a pessoa mais incrível, humana, doce e sensível de todo o meio acadêmico que conheci, e que se destaca pelo seu jeito lindo, doce e didático!

## **APOIO FINANCEIRO**

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG),  
Processo CBB - APQ-02044-15;
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Processo  
424588/2016-1;
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

## RESUMO

**Introdução:** A esquizofrenia é um transtorno mental grave e crônico que afeta cerca de 1% da população e possui importante impacto nos campos da percepção, afeto e pensamento. Vem sendo crescente na literatura a observação de uma importante alteração da resposta imune da esquizofrenia enquanto possível fator etiofisiopatológico da doença. Dentre os diversos mecanismos e vias de sinalizações celulares responsáveis pela produção de mediadores inflamatórios está a via fosfatidilinositol 3-quinase (**PI3K**) / proteína quinase B (**AKT**) / alvo mecanístico da rapamicina (*mechanistic Target Of Rapamycin* - **mTOR**) / glicogênio sintase quinase (**GSK3**). Esta via celular ocorre em diferentes subtipos celulares, incluindo células mononucleares do sistema periférico (CMSP) e exerce diversas funções cruciais ao normal crescimento, desenvolvimento e funcionamento cerebral, funções estas sabidamente comprometidas na esquizofrenia. **Objetivo:** Testar a hipótese de que existe uma desregulação da via de sinalização PI3K/AKT/GSK3/mTOR em CMSP de pacientes com esquizofrenia estáveis clinicamente, o que poderia estar relacionado a um possível padrão diferencial de produção dos mediadores inflamatórios IL-10, MCP-1, IL-1, IL-17A, TNF- $\alpha$  e IL-6. **Métodos:** Neste estudo transversal, 11 pacientes do Instituto Raul Soares com o diagnóstico de esquizofrenia (F20.0 - CID-10), estáveis clinicamente e 11 controles saudáveis recrutados da comunidade que preencheram todos os critérios de elegibilidade foram pareados 1:1 de acordo com sexo, idade e escolaridade. Quantificou-se através dos métodos ELISA e CBA os níveis de citocinas no plasma e em sobrenadantes de CMSP incubadas com inibidores das enzimas PI3K, GSK3 e mTOR e tratadas ou não com o estímulo inflamatório PHA. **Resultados:** Em uma mesma concentração aproximada de  $1 \times 10^7$  CMSP/mL, células de pacientes com esquizofrenia produzem menor quantidade significativa de IL-10 basal em comparação a controles ( $p=0.014$ ). Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os níveis basais da citocinas MCP-1, IL-1, IL-17A, TNF- $\alpha$ , e IL-6 produzidas por CMSP de controles em comparação às produzidas por pacientes com esquizofrenia na mesma condição experimental. Também observamos que o inibidor não seletivo de PI3K (LY294002 1 ou 10  $\mu$ M), o inibidor seletivo PI3K (AS605240 0,1 ou 1  $\mu$ M), o inibidor de GSK3 (CHIR99021 1 ou 3  $\mu$ M) e o inibidor de mTOR (rapamicina 0,5 ou 2,5 nM) não alteraram os níveis das citocinas IL-10, IL-1, IL-17A, TNF- $\alpha$  e IL-6 produzidas por CMSP de controles e

de pacientes com esquizofrenia, tratadas ou não com o estímulo inflamatório PHA. Adicionalmente, o inibidor de GSK3 (CHIR99021, 1 ou 3  $\mu$ M) não alterou os níveis de MCP-1 produzida por CMSP de controles e de pacientes com esquizofrenia, tratadas ou não com PHA. Por outro lado, o inibidor não seletivo de PI3K (LY294002 1 ou 10  $\mu$ M) e o inibidor de mTOR (rapamicina 0,5 ou 2,5 nM) foram capazes de diminuir os níveis de MCP-1 produzida por CMSP obtidas de controles e de pacientes com esquizofrenia, tratadas ou não com PHA. Em relação aos níveis plasmáticos, não encontramos diferenças significativas na concentração das citocinas IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , MCP-1, IL-1 $\beta$  e IL-17A presentes no plasma de pacientes com esquizofrenia em comparação aos controles saudáveis. **Conclusão:** Relacionamos os resultados similares entre pacientes estáveis clinicamente e controles à possível modulação da via celular estudada por medicamentos neuropsiquiátricos. No entanto, os menores níveis basais de IL-10 observados nos pacientes nos trazem *insights* e aponta futuras possibilidades de modulação molecular da doença.

**Palavras-chave:** Esquizofrenia; PI3K; AKT; GSK3; mTOR; CMSP; mediadores inflamatórios

## ABSTRACT

**Introduction:** Schizophrenia is a severe and chronic mental disorder that affects about 1% of the population with significant impact in perception, affection and thought. Recently the literature has been increasing the observation of an important alteration of the immune response of schizophrenia as a possible etiopathological factor. Among several mechanisms and signaling pathways related in the production of inflammatory mediators, the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) / protein kinase B (AKT) / mechanistic target of Rapamycin (mTOR) / glycogen synthase kinase (GSK3) pathway is of particular importance. This cellular pathway occurs in different cell subtypes, including peripheral system mononuclear cells (PBMCs) and is related to several crucial functions to brain growth, development and functioning, which are factors compromised in schizophrenia. **Objective:** To test the hypothesis that there is a deregulation of the PI3K/AKT/GSK3/mTOR signaling pathway in PBMC from clinically stable patients with schizophrenia, which could be related to a possible differential pattern of release of the inflammatory mediators IL-10, MCP-1, IL-1, IL-17A, TNF- $\alpha$  and IL-6. **Methods:** In a cross-sectional study, 11 patients of the Instituto Raul Soares with a diagnosis of schizophrenia (F20.0), clinically stable, and 11 healthy controls from the community, matched 1: 1 according to sex, age and schooling, were recruited for the study. Cytokine levels of plasma and PBMC supernatants, which were incubated with inhibitors of the PI3K, GSK3 and mTOR enzymes, treated or not with the inflammatory stimulus PHA, were quantified by ELISA and CBA. **Results:** Similar concentration of PBMC ( $1 \times 10^7$  cells/mL), cells from patients with schizophrenia produce a lower significant amount of baseline IL-10 as compared to controls ( $p = 0.014$ ). No significant difference was found between baseline levels of the cytokines MCP-1, IL-1, IL-17A, TNF- $\alpha$ , and IL-6 produced by PBMC from controls compared to those produced by patients with schizophrenia in the same experimental condition. We also observed that the non-selective PI3K inhibitor (LY294002, 1 or 10  $\mu\text{M}$ ), the PI3K selective inhibitor (AS605240, 0.1 or 1  $\mu\text{M}$ ), the GSK3 inhibitor (CHIR99021, 1 or 3  $\mu\text{M}$ ) and the mTOR inhibitor (rapamycin, 0.5 or 2.5 nM) did not alter IL-10, IL-1, IL-17A, IL-17A, TNF- $\alpha$  and IL-6 levels produced by PBMC from controls and from patients with schizophrenia treated or not with PHA. In addition, the GSK3 inhibitor (CHIR99021, 1 or 3  $\mu\text{M}$ ) did not alter the levels of MCP-1 produced by PBMC from controls and

from patients with schizophrenia, treated or not with PHA. On the other hand, the non-selective inhibitor of PI3K (LY294002, 1 or 10  $\mu$ M) and the mTOR inhibitor (rapamycin, 0.5 or 2.5 nM) were able to decrease the levels of MCP-1 produced by PBMC obtained from controls and of patients with schizophrenia, treated or not with PHA. Regarding plasma levels, we did not find significant differences in the concentration of IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , MCP-1, IL-1 $\beta$  and IL-17A in patients with schizophrenia compared to healthy controls. **Conclusion:** The similar results between stable patients and controls could be due to the possible stabilization of the PI3K/AKT/GSK3/mTOR by the use of neuropsychiatric drugs. However, the reduced basal IL-10 levels observed in patients indicate new possibilities and insights about the future molecular modulation of this disease.

**Key words:** Schizophrenia; PI3K; AKT; GSK3; mTOR; PBMC; inflammatory mediators

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

**APA** Associação Americana de Psiquiatria  
**ATP** Adenosina Trifosfato  
**CBA** *Cytometric Bead Array*  
**CID** Código Internacional de Doenças  
**CMSP** Células mononucleares do sangue periférico  
**D2R** Receptor dopaminérgico do tipo 2  
**DSM** *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*  
**ELISA** *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*  
**FHEMIG** Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais  
**GSK3** *Glycogen Synthase Kinase 3 beta*  
**ICB** Instituto de Ciências Biológicas  
**IFN** Interferon  
**IL** Interleucina  
**IRS** Instituto Raul Soares  
**LIIM** Laboratório Interdisciplinar de Investigação Médica  
**MeSH** *Medical Subjects Headings*  
**mL** mililitros  
**mTOR** *mechanistic Target Of Rapamycin*  
**nM** nanomolar  
**OMS** Organização Mundial de Saúde  
**PBS** *Phosphate Buffered Saline*  
**PBMC** *Peripheral blood Mononuclear Cell*  
**PDK1** *3-Phosphoinositide-Dependent protein Kinase 1*  
**pH** Potencial de Hidrogênio  
**PHA** Phytohaemagglutinin  
**PIP2** *Phosphatidylinositol 4,5 biphosphate*  
**PIP3** *Phosphatidylinositol 3,4,5 triphosphate*  
**PI3K** *Phosphatidylinositol-3 kinase*  
**PKB** *Protein Kinase B*  
**PTEN** *Phosphatase and tensin homolog on chromosome 10*  
**Raptor** *Regulatory-Associated Protein of mTOR*  
**Rictor** *Rapamycin-insensitive companion of mTOR*

**rpm** rotação por minuto

**SNC** Sistema Nervoso Central

**SNP** *Single-Nucleotide Polymorphisms*

**TCLE** Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**UFMG** Universidade Federal de Minas Gerais

**μL** microlitro

alfa

Beta

Gama

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Características Clínicas e Sócio-demográficas da Amostra Incluída.....	59
<b>Tabela 2</b> - Relação de Medicamentos Utilizados pelos Pacientes no Momento da Coleta do Sangue Periférico.....	62
<b>Tabela 3</b> - n de Pacientes ao uso de Fármacos Antipsicóticos, Benzodiazepínicos e Antidepressivos no Momento da Coleta do Sangue Periférico .....	63

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Representação Esquemática da Cascata de Sinalização Intracelular.....	39
<b>Figura 2</b> - Representação Esquemática da Técnica de ELISA.....	53
<b>Figura 3</b> - Representação Esquemática da Técnica de CBA .....	55
<b>Figura 4</b> – Fluxograma de Seleção de Pacientes e Controles.....	58
<b>Figura 5</b> - Avaliação do efeito de um inibidor de todas as isoformas de PI3K (LY294002) sobre a produção de IL-10 em cultura de CMSP.....	65
<b>Figura 6</b> - Avaliação do efeito de um inibidor seletivo de PI3K (AS605240) sobre a produção de IL-10 em cultura de CMSP.....	66
<b>Figura 7</b> - Avaliação do efeito de um inibidor de GSK3 (CHIR99021) sobre a produção de IL-10 em cultura de CMSP.....	67
<b>Figura 8</b> - Avaliação do efeito de um inibidor de mTOR (rapamicina) sobre a produção de IL-10 em cultura de CMSP.....	68
<b>Figura 9</b> - Avaliação do efeito de um inibidor de todas as isoformas de PI3K (LY294002) sobre a produção de MCP-1 em cultura de CMSP.....	69
<b>Figura 10</b> - Avaliação do efeito de um inibidor seletivo de PI3K (AS605240) sobre a produção de MCP-1 em cultura de CMSP.....	70
<b>Figura 11</b> - Avaliação do efeito de um inibidor de GSK3 (CHIR99021) sobre a produção de MCP-1 em cultura de CMSP. ....	71
<b>Figura 12</b> - Avaliação do efeito de um inibidor de mTOR (rapamicina) sobre a produção de MCP-1 em cultura de CMSP.. ....	72
<b>Figura 13</b> - Avaliação do efeito de um inibidor de todas as isoformasde PI3K (LY294002) sobre a produção de IL-1 em cultura de CMSP.....	73
<b>Figura 14</b> - Avaliação do efeito de um inibidor seletivo de PI3K (AS605240) sobre a produção de IL-1 em cultura de CMSP... ..	74
<b>Figura 15</b> - Avaliação do efeito de um inibidor de GSK3 (CHIR99021) sobre a produção de IL-1 em cultura de CMSP... ..	74
<b>Figura 16</b> - Avaliação do efeito de um inibidor de mTOR (rapamicina) sobre a produção de IL-1 em cultura de CMSP... ..	75
<b>Figura 17</b> - Avaliação do efeito de um inibidor de todas as isoformas de PI3K (LY294002) sobre a produção de IL-10 em cultura de CMSP.....	77
<b>Figura 18</b> - Avaliação do efeito de um inibidor seletivo de PI3K (AS605240) sobre a produção de IL-10 em cultura de CMSP... ..	78

<b>Figura 19</b> - Avaliação do efeito de um inibidor de GSK3 (CHIR99021) sobre a produção de IL-17A em cultura de CMSP.....	79
<b>Figura 20</b> - Avaliação do efeito de um inibidor de mTOR (rapamicina) sobre a produção de IL-10 em cultura de CMSP... ..	80
<b>Figura 21</b> - Avaliação do efeito de um inibidor de todas as isoformas de PI3K (LY294002) sobre a produção de TNF- em cultura de CMSP.....	81
<b>Figura 22</b> - Avaliação do efeito de um inibidor seletivo de PI3K (AS605240) sobre a produção de TNF- em cultura de CMSP... ..	82
<b>Figura 23</b> - Avaliação do efeito de um inibidor de GSK3 (CHIR99021) sobre a produção de TNF- em cultura de CMSP... ..	83
<b>Figura 24</b> - Avaliação do efeito de um inibidor de mTOR (rapamicina) sobre a produção de TNF- em cultura de CMSP... ..	83
<b>Figura 25</b> - Avaliação do efeito de um inibidor de todas as isoformas de PI3K (LY294002) sobre a produção de IL-6 em cultura de CMSP.....	85
<b>Figura 26</b> - A Avaliação do efeito de um inibidor seletivo de PI3K (AS605240) sobre a produção de IL-6 em cultura de CMSP... ..	85
<b>Figura 27</b> - Avaliação do efeito de um inibidor de GSK3 (CHIR99021) sobre a produção de IL-6 em cultura de CMSP... ..	86
<b>Figura 28</b> - Avaliação do efeito de um inibidor de mTOR (rapamicina) sobre a produção de IL-6 em cultura de CMSP... ..	86
<b>Figura 29</b> - Avaliação do efeito de um inibidor de mTOR (rapamicina) sobre a produção de MCP-1 em cultura de CMSP.. ..	88

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	18
<b>1.1 Esquizofrenia: Uma síndrome de diferentes complexidades, prognósticos e particularidades</b> .....	18
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	22
<b>2.1 Neuroimunomodulação: da mútua interação entre os sistemas nervoso central e periférico influenciando sentimento, cognição e comportamento</b> .....	22
<b>2.2 IL-10, MCP-1, TNF , IL-1 , IL-17A, IL-6 e Esquizofrenia: Um interessante correlação</b> .....	26
<b>2.3 Via PI3K/AKT/GSK3/mTOR: Histórico e significância funcional</b> .....	30
<u>2.3.1 Fosfatidilinositol 3-quinase (PI3k)</u> .....	31
<u>2.3.2 Proteína Quinase B (AKT)</u> .....	32
<u>2.3.3 Glycogen syntase kinase-3 (GSK3)</u> .....	36
<u>2.3.4 mechanistic Target of Rapamycin (mTOR)</u> .....	38
<b>2.4 Modulação da via PI3K/AKT/GSK3/mTOR: Uma possível alternativa farmacológica futura para os indivíduos com esquizofrenia?</b> .....	42
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	45
<b>3.1 Objetivo geral</b> .....	45
<b>3.2 Objetivos específicos</b> .....	45
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	46
<b>4.1 Delineamento do Estudo</b> .....	46
<b>4.2 Captação de Pacientes e Controles Integrantes da Pesquisa</b> .....	47
<u>4.2.1 Instituto Raul Soares – Perfil Clínico-Terapêutico e Sócio-demográfico</u> ... ..	47
<u>4.2.2 Seleção de Pacientes e Controles Integrantes da Pesquisa</u> .....	47
<b>4.3 Coleta de dados Clínicos e sócio-demográficos</b> .....	48
<u>4.3.1 Critérios de Inclusão</u> .....	48
<u>4.3.2 Critérios de Exclusão</u> .....	49
<u>4.3.3 Pareamento</u> .....	49
<u>4.3.4 Avaliação de Síndrome Metabólica</u> .....	50

<b>4.4 Coleta e processamento do sangue preiférico</b> .....	50
4.4.1 <u>Obtenção de soro e plasma</u> .....	51
4.4.2 <u>Obtenção de Células Mononucleares de Sangue Periférico (CMSP)</u> .....	51
4.4.3 <u>Do plaqueamento de CMSP com inibidores da via PI3K/AKT/GSK3/mTOR</u> ....	52
<b>4.5 Quantificação de citocinas e quimiocinas</b> .....	54
4.5.1 <u>Quantificação de citocinas e quimiocinas pelo ensaio imunoenzimático ELISA</u> .....	54
4.5.2 <u>Quantificação de citocinas por imunoenensaio citométrico com microsferas – Cytometric Bead Arrays (CBA)</u> .....	55
<b>5 ANÁLISE ESTATÍSTICA</b> .....	57
<b>6 RESULTADOS</b> .....	58
<b>6.1 Características Clínicas e Sócio-demográficas de Pacientes e Controles</b> ...60	
<b>6.2 Mundo Real x Mundo Experimental Ideal: Medicamentos em Uso por Pacientes para a Estabilização Clínica</b> .....	62
<b>6.3 Quantificacao de IL-10</b> .....	65
6.3.1 <u>Avaliação do efeito dos inibidores de PI3K sobre a produção de IL-10 por CMSP de pacientes com esquizofrenia e controles</u> .....	65
6.3.2 <u>Avaliação do efeito do inibidor de GSK3 sobre a produção de IL-10 por CMSP de pacientes com esquizofrenia e controles</u> .....	67
6.3.3 <u>Avaliação do efeito do inibidor de mTOR sobre a produção de IL-10 por CMSP de pacientes com esquizofrenia e controles</u> .....	68
<b>6.4 Quantificacao de MCP-1</b> .....	70
6.4.1 <u>Avaliação do efeito dos inibidores de PI3K sobre a produção de MCP-1 por CMSP de pacientes com esquizofrenia e controles</u> .....	70
6.4.2 <u>Avaliação do efeito do inibidor de GSK3 sobre a produção de MCP-1 por CMSP de pacientes com esquizofrenia e controles</u> .....	72
6.4.3 <u>Avaliação do efeito do inibidor de mTOR sobre a produção de MCP-1 por CMSP de pacientes com esquizofrenia e controles</u> .....	73
<b>6.5 Quantificacao de IL-1</b> .....	74
6.5.1 <u>Avaliação do efeito dos inibidores de PI3K, mTOR e de GSK3 sobre a produção de IL-1 por CMSP de pacientes com esquizofrenia e controles</u> .....	74

<b>6.6 Quantificacao de IL-17A</b> .....	77
<b>6.6.1 Avaliacao do efeito dos inibidores de PI3K sobre a producao de IL-17A por CMSP de pacientes com esquizofrenia e controles</b> .....	77
<b>6.6.2 Avaliacao do efeito do inibidor de GSK3 sobre a producao de IL-17A por CMSP de pacientes com esquizofrenia e controles</b> .....	79
<b>6.6.3 Avaliacao do efeito do inibidor de mTOR sobre a producao de IL-17A por CMSP de pacientes com esquizofrenia e controles</b> .....	80
<b>6.7 Quantificacao de TNF-</b> .....	81
<b>6.7.1 Avaliacao do efeito dos inibidores de PI3K, mTOR e GSK3 sobre a producao de TNF- por CMSP de pacientes com esquizofrenia e controles</b> .....	81
<b>6.8 Quantificacao de IL-6</b> .....	85
<b>6.8.1 Avaliacao do efeito dos inibidores de PI3K, mTOR e GSK3 sobre a producao de IL-6 por CMSP de pacientes com esquizofrenia e controles</b> .....	85
<b>6.9 Resposta média de mediadores inflamatórios encontrados no plasma de pacientes com esquizofrenia e controles</b> .....	88
<b>7 DISCUSSÃO</b> .....	90
<b>8 CONCLUSÃO</b> .....	101
<b>9 APÊNDICES</b> .....	102
<b>9.1 Apêndice A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido</b> .....	102
<b>9.2 Apêndice B – Questionário Clínico e Sócio-demográfico – Pacientes</b> .....	104
<b>9.3 Apêndice C - Questionário Clínico e Sócio-demográfico – Controles</b> .....	109
<b>9.4 Apêndice D - Protocolo de Todas as Etapas para Avaliacao do Padrão de Resposta Diferencial de Células Mononucleares do Sangue Periférico (CMSP) de Pacientes e Controles</b> .....	113
<b>9.5 Apêndice E - Anovas Seguidas de Teste de POSTHOC TUKEY - Representação Estatística Geral da Resposta Média Pacientes com Equizofrenia e Controles Saudáveis Frente a Estímulos Diferentes</b> .....	126
<b>9.6 Apêndice F – Testes de Wilcoxon para amostras pareadas em cada condição experimental - Representação Estatística Geral da Resposta Média entre Pacientes com Esquizofrenia e Controles Saudáveis Frente a um Mesmo Estímulo</b> .....	123

<b>10 ANEXOS</b> .....	144
<b>10.1 Anexo A - Iniciativa STROBE: Subsídios para o Aprimoramento e Apresentação de Resustados Observacionais em Epidemiologia</b> .....	144
<b>11 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	146

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Esquizofrenia: Uma síndrome de diferentes complexidades, prognósticos e particularidades

A Esquizofrenia é um transtorno psiquiátrico grave e crônico que afeta cerca de 1% da população mundial. Desde a sua primeira descrição como “Demência precoce” por Emil Kraepelin no século XIX, o conceito e nomenclatura da esquizofrenia passaram por diversas modificações. Em 1893, Kraepelin descreve pela primeira vez, na quarta edição de seu clássico “Tratados de Psiquiatria” relatos de sua observação sobre pacientes que, apesar de jovens, possuíam duas grandes síndromes: (1) “o enfraquecimento das atividades emocionais que formam as molas propulsoras da volição; e (2) A perda da unidade interna das atividades do intelecto, emoção e volição” (Kraepelin, 1919). Características estas que justificaram na época a nomenclatura da doença enquanto “Demência Precoce”.

Já em 1908, em contraste às observações puramente empíricas de Kraepelin, Bleuler se fundamentou na teoria deste transtorno mental ser um reflexo de anormalidades cerebrais, fato belamente descrito em seu livro “O Prognóstico da Demência Precoce: o grupo das esquizofrenias” (Bleuler, 1908). E foi assim que os termos “Demência Precoce” e “esquizofrenias” (no plural, devido à observação de subtipos da doença) coexistiram por alguns anos. Adicionalmente, Bleuler introduziu a observação que a esquizofrenia também poderia aparecer tardiamente, e apontou seis sintomas fundamentais ao diagnóstico da doença, o famoso “Os 6 As”: associações do pensamento (associations of thought), autismo (autism), ambivalência (ambivalence), embotamento afetivo (affective blunting), distúrbios da atenção (attention disorders) e avolição (avolition) (Bleuler, 1950). A palavra esquizofrenia é um neologismo, sendo sua nomenclatura advinda do grego **schizo-** (= divisão, separação, dissociação), **phrenos-** (= entranhas, alma, mente) e do sufixo **ia-** (indicativo de qualidade) (Portada de etimologías). Assim, podemos entender claramente que a nomenclatura “Esquizofrenia” introduzida por Bleuler no século XX foi formulada em alusão à clara dissociação entre a percepção da pessoa acometida pela doença sobre o mundo e as pessoas à sua volta, e a realidade em si.

Em 1957, em meio à dinâmica clínica do “mundo real” que demanda observação, senso crítico e sensibilidade, Schneider descreveu os seguintes sintomas presentes nos pacientes com esquizofrenia: sonorização do pensamento; escutar vozes sob a forma de argumento e contra-argumento; escutar vozes comentadoras que acompanham as atividades; ter vivências de influência corporal; ter roubo do pensamento e outras formas de influências do pensamento; sentir tudo como sendo feito ou influenciado pelos outros no campo dos sentimentos, pulsões e vontades; ter percepção delirante (Schneider, 1957).

Assim, os conceitos de Kraepelin, Bleuler e Schneider tiveram importante influência sobre a psiquiatria e o auxílio dos primeiros critérios diagnósticos estruturados na década de 70 (Elkis, 2000), servindo de base para a elaboração dos atuais critérios internacionais padronizados para o diagnóstico da esquizofrenia presentes no Código Internacional de Doenças (CID) e no Manual de Diagnóstico e Estatística das Perturbações Mentais (do inglês Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders - DSM). De acordo a última atualização do DSM, o DSM-5, os espectros de sintomas da esquizofrenia envolvem sintomas nos campos de percepção, do afeto e do comportamento. Tais sintomas são classificados enquanto: sintomas positivos (delírios e alucinações), negativos (embotamento afetivo, anedonia, apatia, retraimento social e falta de motivação) e cognitivos (prejuízo na memória, na atenção e dificuldades de formular raciocínio lógico e coerente). E é esta imensa heterogeneidade clínica associada a diferentes mecanismos fisiopatológicos que posiciona a esquizofrenia enquanto uma síndrome. Para o seu atual diagnóstico, devem estar presentes pelo menos dois dos sintomas acima descritos, com duração mínima de 1 mês. Adicionalmente, ao menos um dos sintomas devem ser positivos a fim de aumentar a confiabilidade diagnóstica (American Psychiatric Association, 2013). Interessantemente, o atual caráter neurodesenvolvimental e imune da esquizofrenia situa a etiologia da doença em uma complexa rede de interação entre fatores genéticos e ambientais durante o desenvolvimento do cérebro, fato este que talvez justifique tamanha complexidade e incompreensão de toda a neurobiologia da doença. Seguindo esta linha de pensamento, podemos afirmar que expandir o conhecimento do mecanismo celular imune e neurodesenvolvimental da esquizofrenia, bem como alcançar o ideal manejo farmacológico da doença é um dos principais desafios de pesquisadores da área.

Apesar dos inegáveis e importantes avanços na farmacoterapia da esquizofrenia, especialmente no controle dos sintomas positivos da doença, cerca de 20-30% dos pacientes falham na resposta terapêutica (Stone et al., 2010; Hartling et al., 2012; Stafford et al., 2015) e apenas cerca de 25% dos pacientes manifestam remissão funcional (Haro et al., 2011). Adicionalmente, os sintomas negativos e cognitivos continuam sendo os principais responsáveis pela importante disfunção sócio-ocupacional observada nos pacientes com esquizofrenia. Acredita-se que tais fatos estejam diretamente relacionados a lacunas no conhecimento de alvos moleculares específicos a serem modulados pela neuropsicofarmacologia. Tais informações são nitidamente importantes fatores limitantes da elaboração de medicamentos antipsicóticos mais seguros, eficazes e com menores índices de efeitos colaterais motores, motivacionais e metabólicos (Miller et al., 2017).

Nas últimas décadas, um imenso esforço internacional vem sendo dedicado à compreensão da neurobiologia desta síndrome de diferentes complexidades, prognósticos, comorbidades e particularidades. Não é de se espantar que, com tamanha complexidade, a esquizofrenia é atualmente considerada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) enquanto uma das 20 doenças responsáveis por maior incapacidade na população mundial (Ustun & Chisholm, 2001; OMS, 2002). Em recente revisão sistemática (RS), Jin & Mosweu (2016) reforçam que a deterioração cognitiva e psicossocial presente nos pacientes com esquizofrenia são fatores diretamente relacionados à redução drástica de produtividade e aposentadoria precoce nesta população.

De alto custo social e econômico, esta debilitante doença mental é um importante problema de saúde pública (American Psychiatric Association, 2013; Szkuldecka-Debek et al., 2016). Neste contexto, em projeto paralelo de Overview de RSs realizado em nosso grupo de pesquisa (dados ainda não publicados), observamos que RSs de alta e moderado nível de evidência demonstraram que processos inflamatórios na vida intrauterina (Khandaker et al., 2013) e primeira infância (Khandaker et al., 2012), bem como polimorfismo gênico da citocina pró-inflamatória IL-10 (Gao et al., 2014) são considerados importantes fatores causais da doença. Adicionalmente, infecções ao longo da vida também são relacionados à remissões e/ou pior prognóstico no processo fisiopatológico da doença (Monroe et al., 2015).

Tais dados posicionam a hipótese inflamatória da esquizofrenia, ou seja, processos inflamatórios enquanto importante fator causal ou mesmo remissional da doença, enquanto uma hipótese de alto nível de evidência atualmente. No entanto, a compreensão de mecanismos moleculares e bioquímicos que expliquem as alterações neurodesenvolvimentais e imunes encontradas em pacientes com este transtorno mental permanecem enquanto um imenso desafio para os pesquisadores da área.

Apesar de sua etiologia não estar atualmente completamente elucidada, vem sendo crescente na literatura a observação de um importante alteração neurodesenvolvimental e imune da doença enquanto possíveis fatores etiofisiopatológicos da doença. Dentre os diversos mecanismos e vias de sinalizações celulares responsáveis pela produção de mediadores inflamatórios nos chama a atenção o chamado alvo mecanístico da rapamicina (*mechanistic Target Of Rapamicyn* - **mTOR**), uma serina/treonina/quinase composta por múltiplos componentes proteicos. Sua sinalização intracelular envolve principalmente a fosfatidilinositol 3-quinase (*phosphatidylinositol-3 kinase* - **PI3K**), glicogênio sintase quinase (*Glycogen Synthase Kinase3* - **GSK3**) e a proteína quinase B / serina/treonina quinase (Protein Kinase B / serine/threonine kinase - **AKT**). Esta via celular ocorre principalmente no interior de Células Mononucleares do Sangue Periférico (CMSP), com diversas funções cruciais ao normal crescimento, neurodesenvolvimento e funcionamento neuronal, funções estas altamente comprometidas na esquizofrenia (Freyberg et al., 2010; Kennedy et al., 2016).

Atualmente desconhecemos o real impacto de antipsicóticos na estabilização da via imunológica uma vez que dados da literatura que abordam tais questões apontam determinadas alterações imunes pelas quais possivelmente os antipsicóticos ainda não são capazes de equilibrar. Adicionalmente, trabalhos de alta qualidade metodológica são essenciais para sua melhor elucidação de tais questões (Miller et al., 2016).

Mediante a estes dados, este trabalho visa uma melhor compreensão sobre uma possível desregulação da via de sinalização PI3K-AKT-GSK3-mTOR em células mononucleares do sangue periférico de pacientes com esquizofrenia, sugerindo

novas abordagens moleculares para futuros diagnósticos e farmacoterapia mais eficaz para a esquizofrenia.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Neuroimunomodulação: da mútua interação entre os sistemas nervoso central e periférico influenciando sentimento, cognição e comportamento

As principais características e sinais cardinais de um processo inflamatório foram descritas pioneiramente pelo médico e enciclopedista romano Aulus Cornelius Celsus (25 a.C. - 50 d.C) como dor, calor, rubor e tumor (edema) (Tracy, 2006; Trancas & Santos, 2007). Já no século XIX o patologista alemão Rudolf Virchow introduziu a observação de perda funcional e estabeleceu as bases fisiopatológicas do processo inflamatório (Byers, 1989; Walter & Scott, 2017). Desta forma, os chamados mediadores químicos da inflamação são compostos inicialmente descobertos em respostas inflamatórias agudas. Refletindo sobre tais dados, podemos perceber que durante vários séculos tais moléculas foram unicamente relacionadas à reparação tecidual após uma lesão. No entanto, veremos adiante que tal visão foi naturalmente se modificando com o avanço do conhecimento científico da área.

Paralela à visão de mediadores inflamatórios como moléculas presentes na reparação tecidual, o SNC foi considerado por décadas como um sistema imunoprivilegiado devido à presença da barreira hemato-encefálica. No entanto, no século XX, observou-se que moléculas do sistema imune são capazes de atravessar a barreira hematoencefálica por diversos mecanismos e interagir com neurônios e circuitos neuronais, existindo assim uma mútua e constante interação entre o SNC e o sistema imune periférico. Desta forma, o sistema imune participa direta e indiretamente de processos neurofisiológicos, tais como: neuroplasticidade, neurogênese, formação e consolidação da memória, bem como da síntese, recaptação e liberação de diversos neurotransmissores (Miller et al., 2013a; 2017). De particular importância para este trabalho é a informação de que o sistema imune é dinâmico e sofre flutuações de produção de seus mediadores em diferentes etapas da vida (Abbas et al., 2015).

Com todo este conjunto de conhecimento consolidado através de diversos estudos mundiais com resultados convergentes tanto na pesquisa básica quanto na

epidemiológica, surgiu uma importante linha de investigação científica denominada psiconeuroimunologia, uma área de intensa investigação científica, especialmente a partir da década de 90. Tal termo foi pioneiramente descrito por Robert Ader em 1975 ao se referir à comunicação bidirecional entre os sistemas endócrino, nervoso e imune. Sistemas estes especializados, mas ao mesmo tempo integrados em um processo adaptativo da espécie humana ao longo da evolução, influenciando funções emocionais e cognitivas típicas de nossa espécie (Ader, 1975; 2000).

Com os avanços da pesquisa científica, podemos observar que os chamados “mediadores inflamatórios” são moléculas que participam de vias celulares e cascatas de sinalização não apenas responsáveis por reparação tecidual ou envolvidas em processos neurofisiológicos, como também um conjunto de moléculas com amplas e diferentes especificidades e que, quando em níveis desregulados, e em um contexto inflamatório crônico e não resolvido, podem fazer parte da fisiopatologia de doenças neuropsiquiátricas através da indução de estresse oxidativo, alterações na homeostase do citoesqueleto neural, disfunção mitocondrial, desregulação dos níveis basais de diversos neurotransmissores, peroxidação lipídica citotóxica, e morte neuronal (da Silveira et al., 2019). Assim, mediadores inflamatórios estão envolvidos não apenas em processos de reparação tecidual ou neurofisiológico, como também em processos neuropatológicos presentes em diversos distúrbios psiquiátricos (Haroon et al., 2012; Miller et al., 2013a; 2017).

Desta forma, apesar do sistema imune ser crucial à homeostase orgânica, a desregulação imune persistente e não resolvida ao longo do tempo é capaz de impactar negativamente em diversos estados como humor, cognição, emoções, sentimentos, comportamento, bem como na morfologia neuronal e cerebral (Miller et al., 2009; 2013a; 2017; Haroon et al., 2012; da Silveira et al., 2019). Seguindo esta linha de pensamento e cronograma histórico, chegamos à informação considerada pela revista *Science* em 2010 enquanto um importante insight científico do século XXI: a observação a nível mundial de que níveis anômalos de mediadores inflamatórios fazem parte da fisiopatologia de doenças crônicas (Cousin-Frankel, 2010; *Science*, 2010).

Neste sentido, podemos observar que crescente número de revisões sistemáticas com ou sem meta-análises presentes na literatura científica demonstram de forma convergente que mediadores inflamatórios estão significativamente alterados em pacientes com esquizofrenia (Miller et al., 2011; 2013b; Khandaker et al., 2014; Stuart et al., 2015, Santos et al., 2014) e em seus familiares (Benros et al., 2014). Adicionalmente, investigações epidemiológicas e em modelos animais sobre neurodesenvolvimento demonstram que insultos (ambientais e microbiológicos) em determinadas janelas de vulnerabilidade durante o desenvolvimento do cérebro na vida intrauterina são capazes de induzir níveis anômalos de mediadores inflamatórios na prole de forma persistente. Tal disfunção, que atualmente vem sendo investigada enquanto uma disfunção também com cunho epigenético (Keverne et al., 2014; Bale 2015; Rodgers et al., 2015), é capaz de gerar alterações imunes e gênicas que podem ser herdadas geneticamente pelos próximos descendentes da prole afetada, o que, associado a estressores ambientais inerentes à condição humana do existir, podem predispor à esquizofrenia (Miller et al., 2011; 2013a,b; Khandaker et al., 2014; Stuart et al., 2015; Benros et al., 2014; Macêdo et al., 2012; Passos et al., 2015; Hoogland et al., 2015; da Silveira et al., 2016). E é neste caminho de descoberta científica que a esquizofrenia é atualmente aceita e enquadrada enquanto uma desordem do neurodesenvolvimento e de origem multifatorial. Neste contexto, ainda permanece a busca pela compreensão molecular sobre a desregulação imune observada em pacientes com esquizofrenia.

A palavra interleucina possui origem etimológica interessante. A palavra é um neologismo híbrido, composta pelo prefixo latino **inter-** (entre), pela expressão grega **leukos-** (branca) e pelo sufixo latino **ina-** (substância), e possui como significado “substância extraída das células brancas” (Portada de etimologías). Tal termo foi indexado no MeSH Terms (para maiores informações sobre o MeSH, ver Kim et al., 2016) em 1988 e refere-se a uma grande variedade de moléculas proteicas produzidas, sintetizadas e secretadas por praticamente todo tipo de célula nucleada, incluindo células mononucleares do sangue periférico (CMSP). Importantes mediadoras na comunicação entre o SNC e o sistema imune, as citocinas possuem funções autócrina, parácrina e/ou endócrina. De um modo geral, as interleucinas possuem em comum a capacidade de modular respostas celulares frente a estímulos imunes e inflamatórios. No, entanto, é importante ter a visão crítica de

que, apesar das citocinas e demais mediadores inflamatórios serem categorizados em um grande sistema (o sistema imune), tais moléculas exercem uma imensa variedade de funções (Abbas et al., 2015).

De particular importância para este trabalho, destacamos a proteína de quimiotração de monócitos MCP-1 (do inglês, Monocyte chemoattractant protein-1), o fator de necrose tumoral TNF- $\alpha$  (do inglês, Tumor Necrosis Alpha) e as interleucinas IL-6 e IL-10, IL-1, IL-17A por serem as moléculas investigadas neste trabalho. As citocinas MCP-1, IL-1, IL-17A, TNF- $\alpha$  e IL-6 são denominadas como pró-inflamatórias, ou seja, citocinas capazes de promover o recrutamento de leucócitos para o local de inflamação, com importante papel na iniciação e progressão do processo inflamatório. Por outro lado, estudos pregressos apontam a citocina IL-10 enquanto uma molécula de ação anti-inflamatória, levando à limitação da produção e atividade de tais citocinas pró-inflamatórias (Abbas et al., 2015), processo este que ocorre via ativação de macrófagos (Fiorentino et al., 2016) e via ativação de células T (Gao et al., 2014; Fiorentino et al., 2016). Encontrada em linfócitos, monócitos e células dendríticas, IL-10 possui crucial importância na regulação imune. Seguindo esta linha de raciocínio, podemos perceber claramente que a hiporegulação da IL-10 possui importante impacto negativo na imunoregulação.

Em relação às citocinas pró-inflamatórias, a (MCP-1), também conhecida por CCL2, é uma citocina quimioatraente (ou quimiocina) para monócitos e basófilos, e é produzida pelos leucócitos, monócitos e linfócitos. De particular importância, tal quimiocina é inativa quando ligada à membrana celular. Já o TNF- $\alpha$  é uma glicoproteína sérica produzida por leucócitos e macrófagos ativados, com ação necrosante sobre células tumorais. Sobre as demais interleucinas pro-inflamatórias, a IL-1 (um dos subtipos da interleucina IL-1) é uma interleucina solúvel e produzida principalmente por monócitos e basófilos, enquanto a IL-17A (um dos subtipos da interleucina IL-17), é produzida por linfócitos-T e seus precursores. Finalmente, a IL-6 é uma citocina contexto-dependente, podendo ser pró ou anti-inflamatória de acordo com o meio. Produzida por uma imensa variedade de células, tais como monócitos, linfócitos-T e fibroblastos, a IL-6 possui como importante função o crescimento e diferenciação de linfócitos-T (Abbas et al., 2015). Conforme descrito

abaixo, trabalhos de alto níveis de evidência apontam desregulações nos níveis das moléculas descritas acima em pacientes com esquizofrenia.

## **2.2 IL-10, MCP-1, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-17A, IL-6 e Esquizofrenia: Uma interessante correlação**

A primeira publicação na literatura científica demonstrando importantes alterações morfológicas e funcionais em leucócitos de pacientes com esquizofrenia ocorreu em 1963 por Fessel & Hirata-Hibi (Fessel & Hirata-Hibi, 1963). Desde então, crescente número de publicações de estudos primários apontaram a possível correlação entre disfunção de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) e este intrigante transtorno mental. No entanto, a alta heterogeneidade metodológica de estudos publicados foi, por décadas, um importante desafio para reunir dados suficientes para a realização de revisões sistemáticas com ou sem meta-análises na área. Neste contexto, a realização deste delineamento de estudo foi possível apenas no início do século XXI, a partir do crescimento exponencial de publicações de estudos primários sobre o tema desde a década de 90. Surgiram assim os primeiros trabalhos de alto nível de evidência apontando a existência de uma síndrome inflamatória na esquizofrenia.

Seguindo um cronograma histórico sobre o assunto e com foco na descrição de resultados relacionados apenas às citocinas IL-10, MCP-1, IL-1 $\beta$ , IL-17A, TNF- $\alpha$  e IL-6, Potvin et al. (2008) publicaram a primeira revisão sistemática com qualidade metodológica sobre o tema. Neste importante trabalho coletaram dados de 62 estudos transversais e observaram aumento de IL-6 no plasma ou soro de pacientes com esquizofrenia, em comparação a controles saudáveis. Após agrupar e analisar os dados, os autores não encontraram nenhuma alteração significativa in vivo (soro ou plasma) ou in vitro (produzidas por leucócitos do sangue periférico) de IL-10, IL-1 $\beta$ , IL-6 ou TNF- $\alpha$  de pacientes com esquizofrenia em comparação a controles. É interessante notar que este trabalho foi publicado em 2008, após mais de 4 décadas das observações iniciais de Fessel & Hirata-Hibi sobre o tema.

Já em 2011, Miller e colaboradores realizam uma meta-análise reavaliando os dados anteriores publicados por Potvin et al. (2008) e adicionando novos estudos

publicados. De particular importância, Miller e colaboradores, em uma visão crítica e buscando excelência na coleta de dados, controlaram importantes vieses não controlados anteriormente por Potvin et al. (2008), como o status clínico do paciente e as medicações em uso. Os autores correlacionaram o status clínico, o uso de antipsicóticos e a produção de mediadores inflamatórios, e observaram que, em comparação a controles saudáveis, pacientes com esquizofrenia em primeiro episódio psicótico possuíam níveis elevados de IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ . Já os pacientes em psicose aguda (recaída) possuíam níveis reduzidos de IL-10 e aumentados de IL-6 e TNF- $\alpha$  no sangue periférico. No entanto, foi observado no sangue periférico de pacientes estabilizados clinicamente/ao uso crônico de neuropsicofármacos redução dos níveis de IL-1 e IL-6 em relação aos pacientes em primeiro surto psicótico, demonstrando importantes variações dos níveis de citocinas nos pacientes com esquizofrenia de acordo com o status clínico (Miller et al., 2011) e apontando em sua discussão que diferentes antipsicóticos podem possuir diferentes efeitos no sistema imune. Miller e colaboradores publicaram outra importante meta-análise, em 2013.

Em análise de estudos primários transversais, Miller et al. (2013b) analisaram níveis absolutos e/ou proporções de marcadores da superfície celular de células do sistema imune, glicoproteínas chamadas Grupo de Diferenciação (do inglês Cluster of Differentiation – CD) de pacientes com esquizofrenia em comparação a controles saudáveis. Os autores observaram que pacientes com esquizofrenia em primeiro episódio psicótico possuem CD3% (marcador de superfície de linfócitos T) significativamente menor. Enquanto pacientes em psicose aguda (recaída) possuem níveis totais de leucócitos, CD3, CD4 (marcador de superfície de linfócito T-helper) e a relação CD4/CD8 (relação T-helper/linfócito supressor) significativamente aumentada. Já em análise de estudos primários longitudinais, os autores observaram que no acompanhamento temporal de pacientes inicialmente em surto agudo de psicose e em seguida em tratamento medicamentoso, a relação CD4/CD8 foi observada em níveis decrescentes, enquanto os níveis de CD56 (marcador de superfície de natural killers) foram significativamente aumentando a medida que os pacientes foram estabilizando clinicamente, demonstrando que parâmetros imunes podem variar de acordo com o status clínico (Miller et al., 2013b). Assim, Miller e colaboradores, nos trabalhos de 2012 e 2013b, demonstraram, com alto nível de

evidência, que os níveis de leucócitos, de citocinas, o status clínico, e o efeito antipsicótico são variáveis dependentes e interligadas (Miller et al., 2012; 2013b).

Também em 2013, Qin e colaboradores, em uma revisão sistemática com meta-análise de casos-controles e bem delineada metodologicamente, demonstrou que apesar de alguns estudos primários demonstrarem alterações nos níveis de TNF- $\alpha$  na esquizofrenia, em análise estatística de todos os estudos comparáveis sobre o assunto, polimorfismo de TNF- $\alpha$  não parece estar associado com maior susceptibilidade a desenvolver esquizofrenia (Qin et al., 2013). No entanto, os autores não descreveram sobre o status clínicos ou medicações em uso pelos pacientes avaliados nos estudos primários.

No ano seguinte, outra meta-análise com alto nível de evidência demonstrou que o polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) de dois haplotipos de IL-10 estão significativamente associados ao maior risco de desenvolver esquizofrenia (Gao et al., 2014). Porém, apesar da grande relevância e alta qualidade metodológica do estudo (realizaram a estrutura de busca, critérios de seleção, extração e análise de dados de acordo com o check-list PRISMA - *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analysis\**), Gao e colaboradores também não descreveram sobre o status clínico ou medicações em uso pelos pacientes. (\*para maiores informações sobre o PRISMA, ler Liberati et al., 2009).

Também em 2014, Upthegrove et al., 2014 em uma revisão sistemática com meta-análise seguindo o check-list do PRISMA demonstraram que pacientes com esquizofrenia, em primeiro surto psicótico e virgens de tratamento antipsicótico possuem elevados níveis de IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  a nível periférico (amostras de soro) em comparação com controles saudáveis (Upthegrove et al., 2014), reforçando a hipótese inflamatória da esquizofrenia e a importância do status clínicos para a interpretação de resultados sobre a esquizofrenia.

Em concordância com dados prévios do efeito imunomodulador de antipsicóticos, Capuzzi et al., 2017 avaliaram através de uma meta-análise de estudos longitudinais variações de níveis de citocinas plasmáticas após tratamento antipsicótico em relação aos pacientes com esquizofrenia em seu primeiro surto psicótico e virgens

de tratamento. Os autores observaram diminuição dos níveis de IL-6 e IL-1 após 4 semanas do uso de antipsicóticos, apesar da alta heterogeneidade nos dados sobre IL-1 ter sido observada. Assim, os autores concluíram que IL-6 e e IL-1 podem ser considerados enquanto marcadores de status clínico, com o seu decréscimo observado mediante a estabilização clínica. Enquanto TNF- e IL-17 foram considerados marcadores de traço esquizofrênico, a partir da observação de maiores níveis de TNF- e IL-17 no plasma de pacientes com esquizofrenia virgens de tratamento e em primeiro surto psicótico. Apesar da observação de maiores níveis plasmáticos de TNF- e IL-17 nos pacientes com esquizofrenia, os autores não observaram diminuição significativa a nível plasmático das mesmas após 4 semanas de tratamento antipsicótico (Capuzzi et al., 2017).

Desta forma, ao nos indagarmos sobre o assunto, facilmente pensamos que uma das intervenções possíveis seria a regulação imune dos pacientes através de intervenção farmacológica. Neste contexto, Fond et al., 2014 realizaram uma revisão sistemática de ensaios clínicos randomizados a fim de avaliar a eficácia e risco/benefício de quatro classes de anti-inflamatórios e da minociclina (um antibiótico do grupo das tetraciclina), como tratamento suplementar no tratamento das três mais prevalentes doenças mentais esquizofrenia, depressão unipolar e depressão bipolar. Em relação a esquizofrenia, os autores observaram que inibidores da ciclooxigenase (COX-2) bem como minociclina demonstraram efetividade no tratamento, podendo ser futuramente uma alternativa para casos refratários e resistentes à terapia atual. No entanto, os autores concluíram que o uso destes fármacos devem ser utilizados com cautela em relação aos possíveis efeitos colaterais dos mesmos. Isto ocorre devido ao fato de que uma vez que associados os efeitos colaterais destes fármacos a importantes efeitos colaterais metabólicos e motores dos antipsicóticos, tal alternativa possui grande potencial de impactar negativamente na adesão farmacológica dos pacientes (Fond et al., 2014). Outra bem delineada revisão sistemática de ensaios clínicos randomizados também aponta que a minociclina é capaz de reduzir os escores da PANSS (**P**ositive and **N**egative **S**ymptom **S**cale) total, especialmente nos scores de pontuação dos sintomas negativos. Porém, seu uso concomitante a antipsicóticos falha na diminuição da descontinuação da medicação antipsicótica devido aos efeitos adversos (Oya et al., 2014).

Desta forma, para uma intervenção farmacológica mais eficaz e segura, novos estudos são necessários. A fim de buscarmos uma aprofundada compreensão molecular de qual(is) via(s) celular(es) produtoras de mediadores inflamatórios encontram-se alteradas na esquizofrenia, é crucial considerar o status clínico e os medicamentos em uso pelos pacientes. Desta forma será possível visualizar melhor e mais certo estabelecimento de alvos moleculares a serem estudados futuramente pela química farmacêutica, visando a elaboração de fármacos com menores índices de efeitos colaterais e maior modulação do sistema imune dos pacientes, especialmente os pacientes resistentes aos tratamentos convencionais. Seguindo esta linha de pensamento, existem diversas células e vias intracelulares no organismo humano já bem elucidadas na literatura científica enquanto capazes de modular e realizar a produção de mediadores inflamatórios. Dentre elas estão: a via das Kynureninas, a via de sinalização p38 MAP (p38 mitogen activated protein kinase) e o metabolismo de cascata do ácido araquidônico (Haaron et al., 2012; da Silveira et al., 2019).

No entanto, nos chama a atenção uma via de sinalização intracelular composta pelos componentes proteicos fosfatidilinositol 3-quinase (*phosphatidylinositol-3 kinase* - **PI3K**), proteína quinase B (**AKT**), glicogênio sintase quinase (*glycogen synthase kinase* - **GSK3**) e o alvo mecanístico da rapamicina (*mechanistic Target Of Rapamycin* - **mTOR**), a chamada PI3K/AKT/GSK3/mTOR (Costa-Mattioli & Monteggia, 2013; Keating and McGargill, 2016). Conforme veremos adiante, tal via vem recebendo importante e crescente destaque na pesquisa científica nas últimas décadas.

### **2.3 Via PI3K/AKT/GSK3/mTOR: Histórico e significância funcional**

A via intracelular que envolve as enzimas PI3K, AKT, GSK3 e mTOR é composta por múltiplos componentes proteicos que interagem com diversos substratos, compondo assim uma cascata de sinalização responsável por regular diversas funções celulares que, conforme veremos adiante, coincidentemente ou não, também estão afetadas na esquizofrenia. Tal fato fundamenta a atual hipótese da via PI3K/AKT/GSK3/mTOR ser a base molecular/bioquímica de alguns dos sintomas

observados na prática clínica em pacientes com esquizofrenia. É importante ressaltar que esta via de sinalização está presente nas Células Mononucleares do Sangue Periférico (CMSP), principalmente em leucócitos. Adicionalmente, apesar de receber considerável atenção na ciência básica a algumas décadas, a PI3K/AKT/GSK3/mTOR é uma via intracelular relativamente nova na literatura psiquiátrica, especialmente em se tratando de aplicação clínica deste conhecimento na esquizofrenia (Costa-Mattioli & Monteggia, 2013; Keating and McGargill, 2016).

### 2.3.1 Fosfatidilinositol 3-quinase (PI3k)

PI3Ks compreende uma classe de enzimas fosfotransferases presentes nas membranas plasmáticas de seres eucarióticos. A descoberta desta enzima abriu um novo leque de conhecimento para a biologia molecular em meados dos anos 80, época em que houve um crescimento exponencial da investigação científica intracelular, da biologia molecular, da bioinformática e de estratégias de purificação bioquímica. Estas linhas de investigação, quando associadas, foram capazes de demonstrar a interessante e comum comunicação entre moléculas presentes na membrana plasmática, no citoplasma e no núcleo da célula, tornando possível a observação de cascatas de sinalização e suas consequências biológicas (Vanhaesebroeck et al., 2012).

A nomenclatura fosfatidil inositol 3-quinase ou PI3K (do inglês, phosphatidylinositol-3 kinase) surgiu durante a elucidação da função desta molécula na célula, ou seja, a partir da observação da capacidade do PI3K de fosforilar o poliálcool cíclico inositol na porção 3 do anel desta molécula, observação realizada principalmente em células de mamíferos *in vitro* por diversos pesquisadores independentes e de todo o mundo durante a década de 90 (Vlahos et al., 1994; Burgering et al., 1995; Franke et al., 1995; Alessi et al., 1997; Stokoe et al., 1997; Stephens et al., 1998). Desta forma, sabemos que o PI3K é capaz de catalisar a conversão de fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (do inglês phosphatidylinositol 4,5 biphosphate - PIP<sub>2</sub>) presente na membrana plasmática para o segundo mensageiro fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato (do inglês phosphatidylinositol 3,4,5 triphosphate - PIP<sub>3</sub>) (PI3 Kinases - MeSH terms), iniciando uma cascata de sinalização que culmina na regulação de diversas

funções intracelulares (Vlahos et al., 1994; Burgering et al., 1995; Franke et al., 1994; Alessi et al., 1997; Stokoe et al., 1998; Stephens et al., 1998; Vanhaesebroeck et al., 2012). Estima-se que dentro de cada célula exista cerca de 50 a 100 moléculas efetoras (que reagem ao estímulo) de PI3K, sendo a AKT a molécula considerada como o principal efetora da PI3K (Vanhaesebroeck et al., 2012).

Existem três isoformas da PI3K, todas envolvidas na transdução de sinal de receptores. De particular importância neste trabalho, a PI3K é uma isoforma expressa em leucócitos com importante função na resposta imune (Freyberg & Javitch, 2010; Vanhaesebroeck et al., 2012). No entanto, ainda permanecem escassos projetos de pesquisa avaliando especificamente a disfunção de PI3Ks e esquizofrenia, e desconhecemos a existência de algum trabalho anterior a este que tenha avaliado especificamente uma possível disfunção de PI3K em pacientes com esquizofrenia.

### 2.3.2 Proteína Quinase B ( AKT)

A proteína proto-oncogene AKT é uma serina-treonina kinase que contém domínios proteicos específicos que podem ser ativados pela fosforilação em resposta à fatores de crescimento e insulina (MeSH Terms - AKT). Em 1995, dois grupos de pesquisadores independentes, Franke et al. e Burgering & Coffey, pioneiramente publicaram importantes trabalhos sugerindo que este processo ocorre de maneira PI3K dependente. Sua nomenclatura original (AKT) surgiu a partir do estudo do isolamento de uma cepa de retrovírus observado na prole **AK** de camundongos que desenvolveram linfomas tímicos espontâneos. Tal prole foi criada e estudada pelo cientista húngaro com grande destaque na oncologia, Jacob Furth. Assim, o AK se refere à prole AK, e T à “tumores tímicos” (MeSH Terms - AKT; Franke et al., 1995; Burgering & Coffey; 1995). Atualmente, alguns trabalhos denominam a AKT como “Proteína Quinase B”, ou “Protein Kinase B” – PKB).

Três isoformas de AKT são descritas em células de mamíferos, sendo elas: AKT 1, 2 e 3. Codificadas por genes distintos e com diferentes funções, a AKT1 é a mais abundantemente expressa em comparação às outras duas isoformas, está presente em todo o organismo e possui importante papel na excitotoxicidade do glutamato e apoptose; a AKT2 é expressa principalmente em tecido muscular e relacionada à regulação do metabolismo; já a AKT3 é expressa em cérebro e testículos, e vem sendo muito relacionada ao neurodesenvolvimento pós-natal. Ambas as isoformas AKT1 e 3 vem sendo apontadas na literatura enquanto possivelmente relacionadas à fisiopatologia da esquizofrenia (Emamian, 2012; Howell et al., 2017).

A AKT se localiza principalmente na membrana plasmática e citoplasma celular, mas também pode translocar para o núcleo, locais onde existem PIP3s e toda a cascata de sinalização PI3K/AKT/GSK3/mTOR. Atualmente, sabe-se que a AKT, em sua forma ativada, está envolvida em múltiplas funções celulares. Interessantemente, o acúmulo do conhecimento de como a AKT é ativada no interior da célula foi um longo caminho trilhado a partir de esforços conjuntos de diversos cientistas. Para a ativação da AKT, o PIP3 (caracterizado por Alessi e colaboradores em 1997) se liga ao domínio homólogo da AKT, causando a sua translocação da membrana plasmática para o citosol. No citosol, Stokoe et al., 1997 demonstraram, a partir da cromatografia, o papel dual da PIP3 para a ativação do AKT, sendo o PIP3 crucial não apenas para a translocação do AKT, mas também para a fosforilação especificamente do sítio 308 de treonina da AKT *pelo* 3-Phosphoinositide-Dependent protein Kinase 1 (PDK1), tornando a AKT parcialmente ativa. Desta forma, tal processo é PIP3 dependente, ou seja, apenas ocorre mediante o acoplamento PIP3-AKT (Alessi et al., 1997; Stokoe et al., 1997; Stephens et al., 1998). Apenas em 2005, cerca de 9 anos após a elucidação desta parte inicial da via celular, Sarbassov e colaboradores demonstraram que mTORC2 e sua proteína associada Rictor são necessárias para a fosforilação da porção 473 da serina do AKT, além de facilitar a fosforilação do sítio de ativação 308 de treonina do AKT pelo PDK1, levando à completa ativação de AKT, conforme estudos in vitro em células de mamíferos e de drosófilas (Sarbassov et al., 2005). Tal trabalho abriu perspectivas para o complexo Rictor-mTOR enquanto possível alvo molecular para a farmacologia.

Adicionalmente, a AKT é considerada por diversos autores como ponto central de várias cascatas de sinalização intracelular, interagindo com diversos substratos em diferentes cascatas de sinalização, conforme muito bem ilustrado na revisão narrativa de Emami (2012). Especificamente na via PI3K/AKT/GSK3/mTOR, AKT possui ação direta e indireta sobre GSK3 e mTOR, o que, em conjunto, é crucial para regulação de ciclos celulares, apoptose, sobrevivência neuronal e plasticidade sináptica. Adicionalmente, em nível pré-sináptico, AKT possui importante papel na regulação do tráfico de transporte de aminas biogênicas, como transportadores de dopamina e norepinefrina (Freyberg & Javitch, 2010; Vanhaesebroeck et al., 2012).

Atualmente, a AKT1 é a isoforma mais estudada na esquizofrenia. No entanto, ao realizarmos uma análise da literatura científica atual, observamos importantes discordâncias de resultados que nos leva a reflexões interessantes.

O gene AKT1 foi pioneiramente apontado enquanto um gene de susceptibilidade à desenvolver esquizofrenia por Emami (2004), quando demonstrou sua significativa redução no sistema nervoso central (estudos *post mortem* em cérebros) e periférico (em leucócitos) em pacientes com esquizofrenia do norte europeu em relação a controles. Ainda em 2004, Ikeda e colaboradores genotiparam 507 japoneses com esquizofrenia e 443 controles e também observaram associação entre AKT1 e esquizofrenia na população japonesa. Schawb e colaboradores (2005) encontraram variações na sequência de DNA do AKT1 em uma amostra de 79 “pares de irmãos” de famílias europeias com esquizofrenia. Bajestan e colaboradores (2006) também genotiparam SNPs do gene AKT1 em 321 iranianos com esquizofrenia e 383 controles e observaram a relação entre a presença de haplótipo de AKT1 e o maior risco de desenvolver esquizofrenia em uma população do Irã. Seguindo esta linha de pesquisa, Norton e colaboradores (2007) realizaram um estudo caso-controle no Reino Unido com a genotipagem de 673 pacientes com esquizofrenia e 716 controles, reforçando os dados anteriormente descritos, ou seja, suportando a hipótese de variações gênicas em determinados SNPs de AKT1 ser um fator de susceptibilidade à esquizofrenia. Em recente caso-controle realizado por Kordi-Tamandani & Mir (2016) avaliando uma possível relação entre PI3K e esquizofrenia, foi observado a partir da análise de amostras de DNA sanguíneo de 108 pacientes com esquizofrenia um polimorfismo gênico em PI3KCA no sítio SNP

rs7621329(C/T), uma subunidade alfa-catalítica da enzima, e maior risco de desenvolver esquizofrenia, em comparação a 108 controles saudáveis.

Também em 2004 (mesmo ano da primeira publicação demonstrando associação entre variações nos níveis de AKT1 e esquizofrenia), Ohtuski e colaboradores não encontraram associação entre haplótipos de AKT1 e esquizofrenia em um estudo de caso-controle em 559 pacientes com esquizofrenia e 567 controles de uma população japonesa. Liu et al., 2006 avaliaram 5 SNPs de AKT1 em 218 famílias do Taiwan afetadas com esquizofrenia, não encontrando associação entre AKT1 e esquizofrenia nesta população. Lee et al. (2010) em um estudo caso-controle (283 coreanos com esquizofrenia e 350 controles saudáveis) também não encontraram evidência de associação entre polimorfismo da AKT1 e esquizofrenia em uma população coreana.

Já Liu e colaboradores (2016) mensuraram através da técnica de real-time quantitative reverse transcription polymerase (PCR) os níveis da expressão mRNA do receptor dopaminérgico do tipo D2 (DRD2), PI3K, e AKT1 no sangue periférico de 24 pacientes com esquizofrenia e em primeiro surto psicótico, “drug-naive” e/ou sem o uso de medicamentos psiquiátricos no tempo mínimo de 1 mês, e 21 controles. Interessantemente, os autores encontraram expressão diferencial da via de sinalização de DRD2-PI3K-AKT entre pacientes com esquizofrenia em comparação a controles, com menor expressão gênica de DRD2, PI3K e maior expressão significativa de AKT1 no sangue periférico de pacientes em surto agudo de esquizofrenia em comparação aos controles (Liu et al., 2016). Tais resultados reforçam os dados da possível conexão entre AKT, dopamina e esquizofrenia especificamente. No entanto, como vimos, diversos estudos apontam a hipótese de hipofunção/baixos níveis e/ou disfunções do gene AKT1 na esquizofrenia ou mesmo não encontraram associação entre AKT1 e esquizofrenia.

Assim, estudos que suportam a hipótese de desregulação da AKT1 na esquizofrenia demonstram baixo nível e/ou hipofunção da proteína AKT1 em linfócitos periféricos e cérebro de pacientes com esquizofrenia, bem como polimorfismo gênico de determinados SNPs de AKT1 em pacientes com esquizofrenia em relação a controles. Tais dados foram encontrados em populações humanas diferentes, que

evolutivamente se segregaram em determinados momentos históricos (o que trouxe pequenas variações adaptativas que fenotipicamente podem ser observadas) mas compartilham as mesmas funções e reações bioquímicas no organismo. Assim, os dados acima relatados foram reproduzidos em populações do norte europeu (Emamian et al., 2004), Japão (Ikeda et al., 2004), Europa (Schwab et al., 2005), China (Xu et al., 2007), e Reino Unido (Norton et al., 2007), Irlanda (Thiselton et al., 2008) e Irã (Bajestan et al., 2006; Kordi-Tamandani & Mir, 2016), e suportam a hipótese de hipofunção/baixos níveis e/ou disfunções do gene AKT1 ser um fator de susceptibilidade ao desenvolvimento da esquizofrenia. Por outro lado, outros estudos não confirmam esta hipótese de associação em populações do Japão (Ohtuski et al., 2004), Taiwan (Liu et al., 2006) e Coreia (Lee et al., 2010). Interessantemente, desconhecemos trabalhos avaliando esta enzima na população brasileira.

Dentre as possíveis explicações para as discordâncias de achados estão a variabilidade metodológica, incluindo: pacientes homens e mulheres avaliados conjuntamente e sem segregação de resultados entre eles, o tempo de doença, o status clínico, a estabilidade clínica ou não dos pacientes avaliados e, principalmente, a análise de pacientes “drug-naive”/em primeiro surto psicótico ou pacientes estáveis clinicamente e ao uso de diversos medicamentos neuropsiquiátricos que, conforme veremos mais detalhadamente, são apontados como estabilizadores da via PI3K/AKT/GSK3/mTOR.

### 2.3.3 Glycogen synthase kinase-3 (GSK3)

Glycogen synthase kinase-3 (GSK3) era recentemente descrita apenas enquanto uma enzima quinase envolvida no metabolismo do glicogênio, função esta que justifica a sua nomenclatura. No entanto, com o avanço da bioinformática e demais ferramentas usadas pela química farmacêutica, diversos trabalhos sugerem que a GSK3 é um complexo proteico, em que uma ampla variedade de proteínas orquestram-se para, em conjunto, atuarem sob mais de 100 conhecidos substratos, em uma ampla variedade de vias e funções. Para a fosforilação dos seus substratos, é necessário que os sítios ativos da enzima GSK3 (que compreendem os resíduos 85, 97, 181 e 200) reajam com o fosfato terminal do ATP, ocorrendo assim a

fosfotransferência para o substrato. Para isto, é necessário a coincidência temporal e espacial a nível intracelular do GSK3 e do substrato. No entanto, diversos outros mecanismos envolvendo os mais de 100 substratos do GSK3 atualmente conhecidos vem sendo investigados (para maiores detalhes, ver Beurel et al., 2015).

Adicionalmente, GSK3 vem sendo apontada enquanto crucial na fisiopatologia de diversas desordens como câncer, doenças inflamatórias crônicas, além de doenças neurodegenerativas e psiquiátricas, como esquizofrenia e transtorno bipolar. O interesse científico e farmacêutico em GSK3 cresceu exponencialmente exatamente a partir da década de 90, quando houve importantes publicações relacionando GSK3 em transtorno bipolar (Klein & Melton, 1996; Stambolic et al., 1996) e em Alzheimer (Hanger et al., 1992; Mandelkow et al., 1992). Atualmente relaciona-se a promiscuidade de ações da GSK3 em diferentes vias e moléculas à alta toxicidade vista na prática clínica mediante a pequenas variações na posologia de fármacos que recentemente sabemos que possui como um dos mecanismos de ação a inibição da GSK3, como o estabilizador do humor lítio (Beurel et al., 2015; Matsuda et al., 2019).

Existem diversos mecanismos regulatórios de GSK3 já elucidados, e duas isoformas compõem a sua família: GSK3 $\alpha$  e a GSK3 $\beta$ . Ambas isoformas podem ser reguladas positiva ou negativamente, de acordo com o sítio fosforilado. Em se tratando de esquizofrenia, GSK3 $\beta$  é a isoforma mais comumente estudada e com maior nível de evidência de estar desregulada na esquizofrenia e desordens do humor como o transtorno bipolar. É importante ressaltar que o GSK3 possui um domínio auto-inibitório e é negativamente regulado em sua forma fosforilada (figura 1), conforme demonstrado pioneiramente por Cross et al., 1995. Já o GSK3 em sua forma ativa (não fosforilada) é responsável pelo crescimento, organização do citoesqueleto celular, diferenciação celular, e transcrição gênica de citocinas. Assim, a diminuição da atividade de PI3K/AKT possui como consequência o aumento da atividade do GSK3, uma vez que a fosforilação do GSK3 ocorre pelo AKT, e o GSK3 é inativo em sua forma fosforilada.

Seguindo este raciocínio, acredita-se que a hipofunção de PI3K/AKT observada em pacientes com esquizofrenia e a consequente hiperfunção de GSK3 está

relacionada ao aumento (patológico) de tais funções, levando ao desequilíbrio do sistema imune, alterações da morfologia neuronal e neuroanatômicas encontradas na esquizofrenia.

#### 2.3.4 Mechanistic Target of Rapamicyn (mTOR)

Finalmente, mTOR é uma serina/treonina kinase que apesar de ser codificada por um único gene, é composta por dois complexos, o mTORC1, identificado pela subunidade Raptor (Regulatory-associated protein of mTOR) e o mTORC2, identificado pela subunidade Rictor (Rapamycin-insensitive companion of mTOR). A descoberta do mTOR (do inglês **mechanistic Target Of Rapamycin**) ocorreu ao longo do século XX, e se inicia na ilha de Páscoa, localizada na Polinésia Oriental, no sul do oceano pacífico, local em que viveu o povo **RapaNui** entre os séculos V e VIII d.C. Apesar de considerada um dos lugares mais isolados do Planeta Terra devido à pobre fertilidade do solo associada a diversas catástrofes ecológicas induzidas pelos primeiros colonizadores (Rull et al., 2016), em 1931 o microbiologista dinamarquês Hans Laurits Jensen realizou análise de amostras do solo desta ilha, descrevendo pioneiramente uma bactéria gram positiva nomeada *Streptomyces hygroscopicus*. De particular importância, esta bactéria possui uma relação harmônica e intraespecífica com micélios vegetativos (Jensen, HL, 1931). O princípio ativo da *S. hygroscopicus* foi posteriormente isolado, identificado e nomeado por Vézina et al. em 1975 como Rapamicina [**Rapa-** (em alusão ao povo Rapa Nui) – **micina** (em alusão ao micélio ao qual o princípio ativo foi extraído)]. Em seu interessante e lindo trabalho, Vézina descreve de forma rica e detalhada todos os espectros antimicrobianos, bem como as inúmeras etapas químicas de identificação do composto químico Rapamicina (Vézina et al., 1975). Já em 1991, Heitman e colaboradores observaram que a Rapamicina é capaz de inibir a sinalização de proteínas quinases em leveduras, denominando tais proteínas quinases enquanto alvos da rapamicina (do inglês **Target of Ramacycin**).

Alguns anos depois, Sabers et al., 1995, isolaram em células de mamíferos as mesmas proteínas, surgindo assim, a expressão **mamalian Target Of Rapamycin (mTOR)**. No entanto, a partir da observação da imensa complexidade morfológica, funcional e da presença em outras espécies desse complexo proteico ancorado a

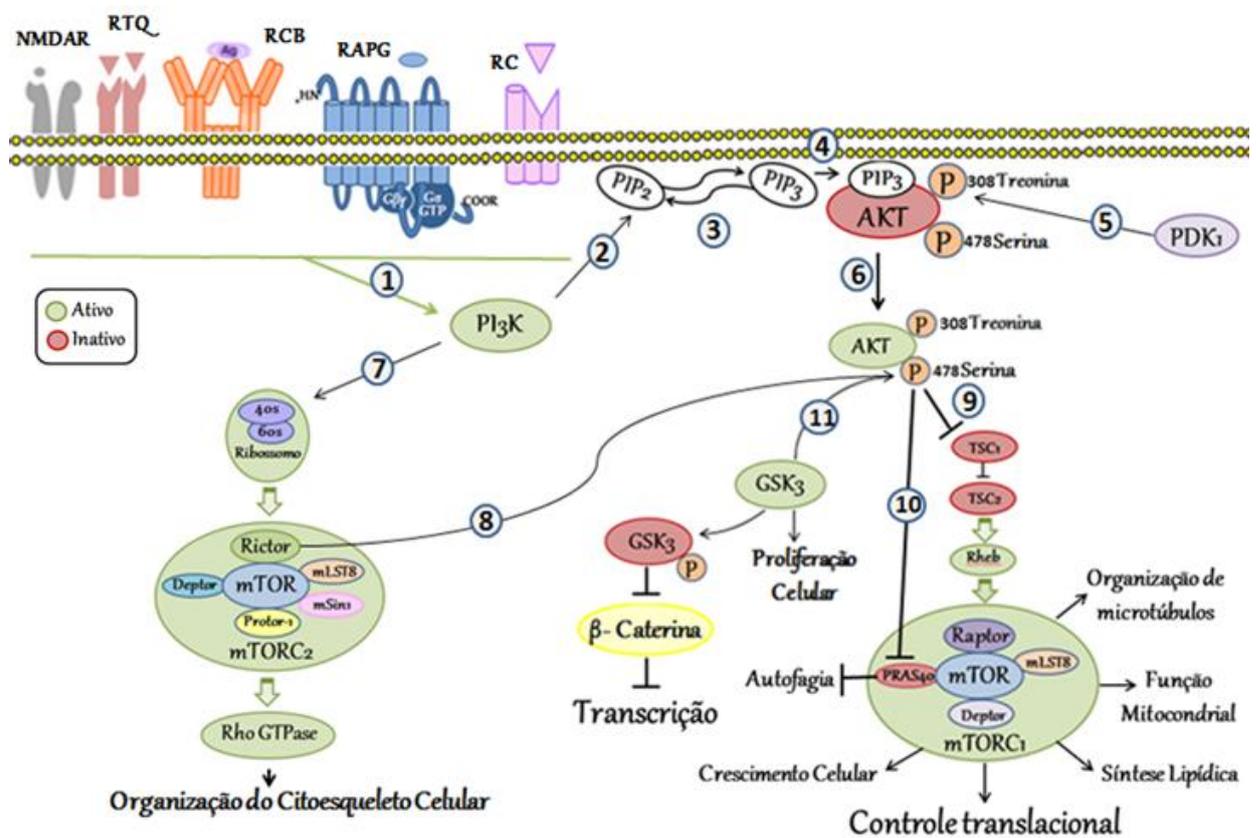
uma quinase, observou-se a mudança da nomenclatura para **mechanistic Target Of Rapamycin (mTOR)** por Laplante e Sabatini (2012). Desta forma, o complexo proteico intracelular mTOR foi nomeado de acordo com o nome do fármaco Rapamicina, um reconhecido inibidor da sinalização intracelular do mTORC1.

Englobando o conhecimento até aqui destrinchado, a via PI3K/AKT/GSK3/mTOR possui papel fundamental na sobrevivência (metabolismo mitocondrial, resistência à insulina, metabolismo e síntese de glicogênio, síntese lipídica, controle translacional), regulação da proliferação celular (crescimento celular, autofagia, poda sináptica), na diferenciação celular (controle do ciclo celular), na morfologia celular (organização de microtúbulos, organização do citoesqueleto celular) (Lee, 2015; Kennedy & Lamming, 2016; Keating and McGargill, 2016). Tais processos são cruciais ao normal crescimento, desenvolvimento, plasticidade e ideal funcionamento cerebral ao longo da vida. Processos estes alterados na esquizofrenia (Costa-Mattioli & Monteggia, 2013; Gururajan & van den Buuse, 2014; Lee, 2015).

Dados recentes sugerem que a atividade da PI3K/AKT/GSK3/mTOR é influenciada por diversos fatores extrínsecos tais como estresse, drogas de abuso e alimentação (Matsuda et al., 2019). Neste sentido, mediante a determinadas situações e/ou estímulos externos, receptores específicos são ativados por um ligante extracelular, como por exemplo **i)** receptores acoplados à proteína G, que podem ser ativados por hormônios, fatores de crescimento, odorantes, fótons de luz, adrenalina, e neurotransmissores como dopamina, serotonina, acetilcolina; **ii)** receptores de tirosina quinase que podem ser ativados por insulina, fatores de crescimento, neurotrofinas (BDNF, NGF), amitriptilina; **iii)** NMDARs, que podem ser ativados por glutamato, ketamina, etanol **iv)** Receptores de células B (presente em linfócitos e células B), que podem ser ativados por antígenos/imunoglobulinas **v)** receptores de citocina, que podem ser ativados por citocinas. De particular importância para este trabalho é o fato de que além de ser uma via intracelular ativada por mediadores inflamatórios, é também uma via moduladora da produção de citocinas, em um ciclo contínuo (ver figura 1).

Todos os ligantes acima citados, bem como seus receptores, estão envolvidos direta e indiretamente na sinalização intracelular mediada pelo AKT e GSK3. Por exemplo, a ativação do AKT pode ocorrer diretamente pela ação de receptores de insulina e de fatores de crescimento, quanto indiretamente pela ação em cascata da ativação do PI3K, com consequente ligação do PIP3 ao AKT, o que torna possível a sua dupla fosforilação pelo mTORC2 e PDK1 e consequente ativação. Da mesma forma, GSK3 pode receber ação direta de receptores acoplados à proteína G (RAPG), receptores de insulina, de tirosina quinases, ou ação indireta pelo PI3K/AKT, que também são influenciados pelos mesmos receptores, em um contínuo ciclo. Por uma questão estética e didática, todas estas possibilidades não foram representadas na figura 1. Apesar disto, é importante o conhecimento destas possibilidades diretas e indiretas da via.

Na figura 1 abaixo podemos visualizar como a cascata de sinalização PI3K/AKT/GSK3/mTOR regula vários aspectos sabidamente implicados na fisiopatologia da esquizofrenia (Lipton & Sahim, 2014; Kennedy & Lamind, 2016).



**Figura 1. Representação Esquemática da Cascata de Sinalização Intracelular PI3K/AKT/GSK3/mTOR.** 1) Mediante à estimulação e ativação de diversos receptores e proteínas transmembrana, PI3Ks inicialmente ligadas a receptores são recrutada para o citoplasma da célula 2) PI3K atua sobre PIP<sub>2</sub> e catalisa a conversão de PIP<sub>2</sub> presente na membrana celular para PIP<sub>3</sub>. 3) PIP<sub>3</sub>, por sua vez, recruta proteínas com domínios específicos, como o AKT e PDK1 4) Ainda na membrana plasmática, PIP<sub>3</sub> se liga ao domínio homólogo da AKT, o que é crucial para a posterior fosforilação desta tirosina quinase bem como para a sua translocação para o citosol celular 5) PDK1 fosforila a AKT especificamente no sítio Treonina308, levando à sua monofosforilação e consequente ativação parcial 6) Parcialmente ativada, AKT é translocada da membrana plasmática para o citosol celular. 7) Paralelamente, PI3K leva à ativação do complexo proteico mTORC2 (identificado pela subunidade Rictor) através de sua associação com ribossomos. 8) Rictor-mTORC2 fosforila a AKT presente no citoplasma em seu sítio de ativação Serina473, causando a ativação total da AKT 9) Duplamente fosforilada e consequentemente totalmente ativa no citoplasma celular, AKT ativada leva à fosforilação do complexo inibitório TSC1 e 2, com consequente liberação do Rheb e ativação do complexo proteico mTORC1 (identificado pela subunidade Raptor), que, por sua vez, está diretamente relacionado a diversas funções celulares e neuronais, tais como síntese lipídica, função mitocondrial, organização de microtúbulos, crescimento celular, inibição da autofagia, controle translacional e síntese de proteínas como citocinas e quimiocinas 10) Em paralelo, AKT fosforila e inativa a porção PRAS40, o que possui importante função fisiológica de inibição da autofagia descontrolada. 11) Adicionalmente, AKT fosforila o GSK3 (ativo em sua forma não fosforilada) levando à inativação do GSK3. A inativação de GSK3 pelo AKT previne a fosforilação e degradação da -caterina pelo GSK3. Consequentemente, -caterina inibe a proliferação celular e a síntese de glicogênio desordenada, e se acumula no núcleo celular, interagindo com fatores de transcrição do DNA, inibindo assim a transcrição de citocinas e quimiocinas. **Siglas:** Phosphatidylinositol 3-Kinases (PI3K); phosphatidylinositol 4,5 biphosphate (PIP<sub>2</sub>); phosphatidylinositol 3,4,5 triphosphate (PIP<sub>3</sub>); 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1); mechanisticTarget Of Rapamycin (mTOR); Rapamycin-insensitive companion of mTOR (Rictor) ; Regulatory-associated protein of mTOR (Raptor); Protein Kinase B (AKT) ; Glycogen Synthase Kinase 3 beta (GSK3) ; Receptor NMDA (NMDAR); Receptor Tirosina Quinase (RTQ); Receptor de Citocinas (RC), Receptor Acoplado à Proteína G (RAPG); Receptor de Células B (RCB); Phosphatase and tensin homolog (PTEN).

Adicionalmente, vimos que esta via celular é fundamental para o controle da autofagia e proliferação celular em processos cancerígenos. Coincidentemente ou não, há maior incidência de alteração de proliferação celular nos pacientes com esquizofrenia em comparação com a população sem a doença. Na literatura científica encontra-se diversas Revisões Sistemáticas com resultados conflituosos sobre o assunto, alguns demonstrando um aumento de risco de mortalidade por câncer em geral (Zhuo et al., 2017) e aumento do risco de câncer de mama em

mulheres com esquizofrenia (Zhuo & Triplet, 2018) em comparação com a população em geral ou sem esquizofrenia. Já outras Revisões Sistemáticas demonstram menor incidência de câncer de fígado em pacientes do sexo masculino e com esquizofrenia (Xu et al., 2017) em comparação com a população em geral ou indivíduos sem esquizofrenia. Talvez tais dados conflitantes sejam melhor compreendidos ao analisarmos os fatores de confusão relatados pelos autores, como: (1) a alta heterogeneidade dos dados em estudos primários; (2) o alto índice de tabagismo, tendência a estilo alimentar e de vida menos saudável no grupo de pessoas com esquizofrenia; (3) o uso de antipsicóticos com diversos efeitos colaterais e a obesidade elevada na população com esquizofrenia (Xu et al., 2017; Zhuo et al., 2017; Zhuo & Triplet, 2018) e, principalmente (observação própria), (4) a baixa qualidade metodológica das Revisões Sistemáticas sobre o assunto, observação esta realizada após análise de pontuação das mesmas na aplicação do check-lists AMSTAR - Avaliação de Múltiplas Revisões Sistemáticas (*do inglês, Assessment of Multiple Systematic Reviews*) e PRISMA (para maiores informações sobre o AMSTAR, ler Shea et al., 2009a,b; Costa et al., 2015).

No entanto, apesar de dados divergentes sobre o assunto, a observação sobre uma importante alteração de proliferação celular (seja ela maior ou menor) nos pacientes com esquizofrenia em relação a população em geral ou sem esquizofrenia vem sendo observada por diversos pesquisadores nas últimas décadas. Assim, neste trabalho pioneiramente destacamos que tal desregulação do papel funcional da via intracelular PI3K/AKT/GSK3/mTOR possa estar associada à alteração na proliferação celular encontrada nos pacientes com esquizofrenia.

#### **2.4 Modulação da via PI3K/AKT/GSK3/mTOR: Uma possível alternativa farmacológica futura para os indivíduos com esquizofrenia?**

Sendo tal via celular de provável importância na etiopatologia da esquizofrenia, pensar em fármacos com ação ativadora ou inibidora em diferentes pontos desta via intracelular é um importante primeiro passo metodológico de uma futura investigação científica. Dentre estes fármacos, destacam-se: o 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002), o primeiro inibidor enzimático sintético de todas as isoformas da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), descoberto através de

experimentos realizados por Vlahos em 1993, e registrado em 1994 (MeSH Terms - LY294002; GenBank: LY294002; Vlahos et al., 1994); o AS605240, registrado em 2005 enquanto um inibidor específico da enzima PI3K $\gamma$  (MeSH Terms- AS605240); o CHIR99021, registrado em 2003 enquanto um inibidor de GSK3 (MeSH Terms- CHIR99021); e a Rapamicina, que como descrito anteriormente, é um potente inibidor do complexo proteico mTOR. Em contrapartida, o Phytohaemagglutinin (PHA) é reconhecido enquanto um estímulo inflamatório. Muito utilizado em culturas celulares para o estudo do sistema imune, o PHA atua estimulando a ativação e expressão de um grande conjunto de genes da resposta imune, com consequente transcrição gênica de mediadores inflamatórios como citocinas e quimiocinas (Minias et al., 2019).

A Rapamicina é capaz de inibir o complexo proteico mTORC1. Este processo ocorre através da proteína de ligação chamada FKBP12, que inibe diretamente mTORC1. A inibição do complexo mTORC2 é ainda discutida na literatura e não completamente elucidada. Um dos possíveis mecanismos é que, apesar do mTORC2 ser insensível à exposição aguda da Rapamicina, a exposição crônica à este fármaco é capaz de reduzir a atividade deste complexo proteico. A possível inibição de mTORC2 pela Rapamicina bem como o mecanismo pelo qual isto ocorre é ainda discutido e controverso na literatura científica (Kennedy and Lamming, 2016).

É importante frisar que todas as moléculas acima citadas são drogas com ação direta ou indireta na via intracelular da mTOR, possuindo em comum a ação na via em diferentes pontos, com consequente inibição ou ativação da transcrição gênica de mediadores inflamatórios. Desta forma, através de um delineamento transversal e utilizando-se de cultura celular, este trabalho pretende testar a hipótese de que existe uma possível desregulação da via de sinalização PI3K/AKT/GSK3/mTOR em pacientes com esquizofrenia estáveis clinicamente, o que poderia contribuir para um padrão diferencial de produção de citocinas em relação aos indivíduos controles. Para isto, optamos pela realização de um estudo transversal.

De acordo com Almeida Filho e Rouquayrol (2002) no clássico livro "Introdução à Epidemiologia", a definição que melhor distingue o estudo transversal dentre os demais estudos observacionais analíticos é o fato de que se trata de um estudo

populacional seccional no tempo em que a variável dependente **Doença (ou Efeito)** e a variável independente **Causa** são observadas simultaneamente em um mesmo momento do fluxo histórico da doença. Desta forma, este tipo de desenho experimental é considerado a mais usual escolha na investigação da saúde coletiva para o teste de hipótese de associação entre variáveis, bem como para testar a validade comparativa individual ou mesmo contextual, como é o foco deste trabalho.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Testar a hipótese de que existe uma desregulação em vias de sinalização PI3K/AKT/GSK3/mTOR de Células Mononucleares do Sangue Periférico (CMSP) de pacientes com esquizofrenia estáveis clinicamente, o que poderia contribuir para um padrão diferencial de produção de mediadores inflamatórios em relação aos indivíduos controles.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Testar a hipótese de que a produção das citocinas IL-10, MCP-1, IL-1 , IL-17A, TNF- e IL-6 por CMSP de pacientes estáveis clinicamente, expostas ou não a um estímulo inflamatório, é diferente da produção das mesmas citocinas obtidas de controles saudáveis;
- Testar a hipótese de que a inibição farmacológica das enzimas PI3K, GSK3 e mTOR em CMSP expostas ou não a um estímulo inflamatório, é capaz de regular diferencialmente a produção das citocinas IL-10, MCP-1, IL-1 , IL-17A, TNF- e IL-6 por CMSP de pessoas com esquizofrenia estáveis clinicamente em comparação a indivíduos controle;
- Testar a hipótese de que existe diferença nos níveis plasmáticos das citocinas IL-10, MCP-1, IL-1 , IL-17A, TNF- e IL-6 entre pessoas com esquizofrenia estáveis clinicamente em relação a indivíduos controle.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Delineamento do Estudo

Para a realização deste trabalho foi realizado um estudo transversal. Foram avaliados enquanto potenciais participantes da pesquisa pacientes do IRS com diagnóstico de esquizofrenia (F20.0), com estabilidade clínica relatada no prontuário e pelos residentes de psiquiatria. Foram considerados estáveis clinicamente pacientes que obtiveram pontuação máxima de 19 na pontuação dos sintomas positivos da PANSS (Positive and Negative Syndrome Scale) e sem mudança recente (último mês) na prescrição. Já os controles foram recrutados da comunidade. Pacientes e controles foram pareados 1:1 por sexo, idade e grau de escolaridade. O período de recrutamento de pacientes e controles bem como a coleta de dados ocorreram de 31/10/2017 à 09/01/2018.

Uma vez que acreditamos que a credibilidade de um estudo depende de sua robustez metodológica, para o norteamento da construção metodológica deste trabalho, e sobretudo para a alta qualidade de descrição e apresentação de dados pré e pós-analíticos de forma transparente, precisa e completa, seguimos a metodologia conhecida como “Aprimoramento e Apresentação de Resultados de Estudos Observacionais em Epidemiologia”, (do inglês STROBE - **S**trengthening the **R**eporting of **O**bservational Studies in **E**pidemiology). O STROBE é composto por um check-list contendo 22 itens com recomendações para a descrição e apresentação clara e coerente de todos os itens que idealmente devem ser encontrados no título, resumo, introdução, objetivo, metodologia, resultados e discussão de um bom estudo observacional. Originalmente publicado em inglês, o STROBE foi traduzido e adaptado para diversas línguas, inclusive para o português, por Malta e colaboradores em 2010 (Malta et al., 2010). Para visualização completa das 22 recomendações veja **ANEXO A**.

## 4.2 Captação de pacientes e controles integrantes da pesquisa

### 4.2.1 Instituto Raul Soares: Perfil Clínico e Sócio-demográfico

Os pacientes foram provenientes do Instituto Raul Soares (IRS), um hospital de ensino credenciado à rede FHEMIG (Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais) que presta assistência psiquiátrica no contexto do SUS (Sistema Único de Saúde), nos níveis de urgência, internação de curta e média permanência, e atendimento ambulatorial (Residência de Psiquiatria). Além do mais, o IRS possui importante papel na investigação científica. A realização deste trabalho foi aprovada pelo Comitê Ética em Pesquisa (COEP) número de registro no COEP 0038.0.287.000-10.

O perfil clínico e sócio-demográfico dos pacientes com esquizofrenia provenientes do IRS inclui: pacientes oriundos de diversas cidades da periferia de BH, de ambos os sexos, em geral de baixa escolaridade e renda, frequentemente refratários aos tratamentos convencionais, e em politerapia. A seleção do IRS para a realização deste trabalho foi realizada de acordo com critérios de conveniência.

### 4.2.2 Da seleção de pacientes e controles integrantes da pesquisa

Pacientes com esquizofrenia do IRS foram selecionados para convite à pesquisa após análise de prontuários. Já os controles foram provenientes da comunidade. Os indivíduos que aceitaram participar da pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (**APÊNDICE A**) passaram por coleta de dados clínicos e sócio-demográficos, avaliação psiquiátrica, metabólica e padronização psicométrica. Os critérios de inclusão e exclusão da pesquisa são descritos adiante. Os indivíduos que preenchiam todos os critérios de inclusão e que não preenchiam nenhum dos critérios de exclusão foram convidados para a coleta do sangue venoso.

É importante frisar que a coleta e processamento do sangue venoso dos pares pareados 1:1 de paciente-controle foram realizadas preferencialmente no mesmo dia. Quando não possível, devido à dificuldade de encontrar controles pareados 1:1

com pacientes, a coleta e processamento do sangue do controle foi realizada no máximo no experimento seguinte, e utilizando as mesmas soluções utilizadas no seu par paciente.

### 4.3 Coleta de dados clínicos e sócio-demográficos

A coleta de dados clínicos e sócio-demográficos de pacientes e controles foram realizadas através de questionários. Já para a avaliação psiquiátrica e padronização psicometrica, foi aplicada a escala **Mini International Neuropsychiatric Interview - MINI-Plus** em pacientes e controles, e a escala **Positive and Negative Syndrome Scale - PANSS** em pacientes por psiquiatras integrantes do grupo de pesquisa. O MINI-Plus é uma escala breve, semi estruturada, e que permite avaliação psiquiátrica de acordo com os critérios do DSM-IV e CID-10 (Amorin, 2000). Ela foi utilizada neste trabalho para confirmação diagnóstica de pacientes, exclusão de pacientes com outras comorbidades psiquiátricas, e exclusão de controles com distúrbios psiquiátricos. Já o PANSS (Kay et al., 1987) é uma escala instrumento que fornece informações da gravidade da sintomatologia da esquizofrenia (Leucht et al., 2005), e foi aplicada por residentes de psiquiatria do IRS.

É importante ressaltar que para melhor conforto do entrevistado e visando a otimização da aplicação dos questionários, optamos por colocar breves perguntas referentes aos critérios de inclusão e exclusão no início do questionário. Adicionalmente, a fim de evitar viés de seleção, introduzimos no questionário de seleção de pacientes e controles, perguntas associadas a fatores em que a via PI3K/AKT/GSK3/mTOR sabidamente está implicada. Assim, buscamos controlar os fatores descritos na literatura enquanto potenciais vieses de avaliação da via celular através dos fatores de inclusão, exclusão e pareamento apresentados abaixo. Para a visualização dos questionários na íntegra, veja os **APÊNDICES B e C**.

#### 4.3.1 Critérios de inclusão:

- ✓ Idade entre 20 e 50 anos;
- ✓ Pacientes com diagnóstico de esquizofrenia (F20.0) relatado no prontuário do paciente e confirmado pela aplicação do MINI-plus (Amorin, 2000);

- ✓ Pacientes com estabilidade clínica informada no prontuário e pelos profissionais de saúde envolvidos em seu tratamento;
- ✓ Indivíduos controles sem diagnóstico de esquizofrenia ou demais doenças mentais, confirmado pela aplicação do MINI-plus (Amorin, 2000);
- ✓ Preenchimento e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

#### 4.3.2 Critérios de exclusão:

- ✓ Relato de presença de patologias neurológicas primárias (Epilepsia, Demências, Tumores, Traumatismo Crânio-Encefálico grave, etc);
- ✓ Relato de infecção pelo HIV/AIDS;
- ✓ Relato de ter feito uso de anti-inflamatórios, corticóides, antivirais ou antibióticos nas 2 semanas anteriores;
- ✓ Relato de ter feito uso de bebidas alcoólicas na noite anterior ao teste;
- ✓ Presença de comorbidades psiquiátricas confirmada pela aplicação da escala Mini-Plus ou relatada(s) no prontuário (no caso de pacientes);
- ✓ Pessoas controles com desordens psiquiátricas ou com parentes de primeiro grau com desordens psiquiátricas;
- ✓ Relato de presença de doença autoimune;
- ✓ Relato de diagnóstico de câncer nos últimos 5 anos;
- ✓ Presença de síndrome metabólica de acordo com os critérios da *National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III* (NCEP/ATP III) – (descrito no item 4.3.4).

#### 4.3.3 Pareamento:

Os indicadores de aproximação/pareamento escolhidos para este trabalho foram gênero, idade e escolaridade. Este último foi pensado a partir de dados da literatura que indicam que a escolaridade é uma medida indireta de estresse, qualidade de vida e estilo alimentar, fatores estes altamente influenciáveis e/ou influenciados pela via intracelular PI3K/AKT/GSK3/mTOR. Assim, os indivíduos com esquizofrenia e controles foram pareados 1:1 de acordo com gênero, idade, e nível de escolaridade, visando aproximar ao máximo pares de paciente-controle com semelhanças não apenas biológicas e clínicas (altamente relacionadas a gênero/idade), mas também

econômicas, alimentares e sociais (altamente relacionadas ao grau de escolaridade).

#### 4.3.4 Avaliação de Síndrome Metabólica

Neste estudo adotamos a definição Síndrome Metabólica (SM) de acordo com a *National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III* (NCEP/ATP III). De acordo com ela, para a caracterização da síndrome metabólica o indivíduo deve apresentar pelo menos três dos cinco seguintes critérios: glicose  $\geq 100$  mg/dL ou em tratamento para hiperglicemia; HDL-colesterol - homens:  $< 40$  mg/dL ou em tratamento para HDL baixo e mulheres:  $< 50$  mg/dL ou em tratamento para HDL baixo; triglicérides  $\geq 150$  mg/dL ou em tratamento para triglicérides elevados; obesidade cintura  $\geq 102$  cm para homens ou  $\geq 88$  cm para mulheres; hipertensão  $\geq 130 \times 85$  mmHg ou em tratamento medicamentoso para HAS (NCEP, 2002). Desta forma, para avaliação de síndrome metabólica, dados clínico-antropométricos (coletados na aplicação do questionários - **APÊNDICES B e C**) e dados laboratoriais (obtidos através da coleta de sangue periférico) foram necessários.

Para a seleção dos pacientes, foi realizada uma prévia avaliação de prontuários e banco de dados do IRS objetivando uma pré-seleção de pacientes com esquizofrenia F20.0), sem demais comorbidades psiquiátricas, com estabilidade clínica relatada no prontuário e/ou pelos residentes de psiquiatria, e com idade entre 20 e 50 anos.

#### **4.4 Coleta e processamento do sangue periférico**

Após o preenchimento do TCLE (**APÊNDICE A**), as coletas de sangue periférico de pacientes foram realizadas na sala de coleta de material biológico do IRS. Para tanto, foram utilizados materiais descartáveis e aplicação de correta técnica de assepsia e punção venosa por profissional treinado e devidamente qualificado. O material biológico coletado foi devidamente identificado e levado imediatamente, a temperatura ambiente, ao Laboratório Interdisciplinar de Investigação Médica (LIIM), localizado na sala 281 da Faculdade de Medicina da UFMG, para a realização de obtenção de soro, plasma e das células mononucleares do sangue periférico. Soro e

plasma foram obtidos e armazenados a -20 C. No dia de sua análise bioquímica, o soro foi transportado em caixa térmica e gelo para o setor de Patologia do Colégio Técnico (Coltec) da UFMG para avaliação do perfil lipídico de pacientes e controles.

#### 4.4.1 Obtenção de soro e plasma

Seis (6)mL do sangue periférico de pacientes e controles foram coletados em tubos a vácuo sem heparina para a obtenção de soro visando a avaliação do perfil lipídico dos indivíduos. Da mesma forma, 6mL do sangue periférico de pacientes e controles foram coletados em tubos a vácuo com heparina para a obtenção de de plasma visando a avaliação de citocinas plasmáticas. Para a coleta do soro e plasma foi realizada centrifugação a 3000 rpm, 4°C, por 10 minutos. Para a avaliação do perfil lipídico foram feitas dosagens bioquímicas do soro dos participantes no espectrofotômetro a 500 nm, utilizando-se os kits comerciais específicos BioClin® Colesterol Monoreagente e BioClin® Triglicérides Monoreagente. Resumidamente, este é um teste enzimático colorimétrico, em que a cor produzida pelo substrato é proporcional à concentração do analito avaliado. Todo o procedimento foi realizado de acordo com orientações do fabricante (BD Bioscience, San Diego, CA, USA). Já para avaliação das citocinas plasmáticas foram utilizadas a técnica de CBA, detalhada adiante.

#### 4.4.2 Obtenção de Células Mononucleares do Sangue Periférico (CMSP)

Para a obtenção de Células Mononucleares do Sangue Periférico (do inglês Peripheral blood Mononuclear Cell - PBMC), em 20 mL de sangue periférico de pacientes e controles coletados em tubos a vácuo contendo heparina sódica foi adicionado 20 mL de Tampão Fosfato-Salino 1x (do inglês Phosphate Buffered Saline - PBS) (Sigma Aldrich Chemicals, St Louis, MO, USA) estéril, em proporção de 1:1. A solução formada foi vertida lentamente em tubos falcons contendo 20 mL de Ficoll-Paque (GE Healthcare, Piscataway, USA), mantendo a proporção 1:1. A solução formada foi centrifugada a 1200 rpm, 21°C, aceleração 9, desaceleração 4, durante 40 minutos. Deste processo, formou-se uma solução heterogênea, com separação dos elementos figurados do sangue e possível coleta e separação de CMSP. Tais células foram coletadas cuidadosamente com auxílio de pipeta e

transferidas a demais tubos falcons. Em seguida, objetivando a remoção dos resíduos citotóxicos de Ficoll-Paque, foram adicionados aos tubos falcons 35 mL de PBS 1x estéril, seguida de nova centrifugação (1500 rpm, 4°C, durante 7 minutos, aceleração 9, desaceleração 7). O sobrenadante foi descartado e o procedimento repetido.

Ao pellet coletado após este procedimento (constituído de CMSP), foi adicionado 1 ml de uma solução constituída de bicarbonato, aminoácidos essenciais e vitaminas que favorece a viabilidade celular, o chamado meio RPMI-1640 (desenvolvido no Roswell Park Memorial Institute) estéril suplementado a penicilina 200 U/mL e estreptomicina 0.1 mg/mL, 1 mM L-glutamina e 10% de soro humano inativado AB Rh+ (Sigma Aldrich Chemicals, St Louis, MO, USA). Em seguida, as células mononucleares do sangue periférico coletadas foram coradas com azul de Tripán (na proporção de 1:20v/v) para avaliação da viabilidade celular. Finalmente, as células foram contadas na câmara de Neubauer e sua concentração igualada para concentração final de  $1 \times 10^7$  células por mL de RPMI, de modo a todos os integrantes da pesquisa terem soluções com a mesma concentração de leucócitos, fator crucial aos próximos passos e à correta interpretação dos resultados obtidos neste trabalho.

#### 4.4.3 Do plaqueamento de CMSP com inibidores da via PI3K/AKT/GSK3/mTOR

Em seguida, as células mononucleares na concentração final de  $1 \times 10^7$  /mL foram adicionadas em placas de fundo em U para a realização de bloqueio da via de sinalização PI3K/AKT/GSK3/mTOR presente no interior de leucócitos. Para tanto, foram utilizadas as seguintes drogas nas seguintes concentrações:

- LY294002 (inibidor de todas as isoformas da PI3K) nas concentrações de 10 e 1 microM;
- AS605240 (Inibidor enzimático de PI3K ) nas concentrações 0,1 e 1 microM;
- Rapamicina (inibidor do complexo proteico mTOR) nas concentrações 2,5 e 0,5 nM;
- CHIR99021 (inibidor de GSK3 ) nas concentrações 3 e 1 microM;

A escolha das concentrações baseou-se na literatura prévia, nas concentrações inibitórias de 50% (IC50) e em trabalhos prévios de nosso grupo de estudos. Assim, para cada poço da placa em fundo em U, 20 µL de CMSP na concentração de

$1 \times 10^7$ /mL foram plaqueadas juntamente com 160  $\mu$ L de RPMI suplementado ou 160  $\mu$ L de LY294002, AS605240, Rapamicina e CHIR99021. Todas as drogas foram pipetadas em duplicata e em duas concentrações: em concentrações maiores (1) e concentrações menores (2) mostradas acima. Em seguida, as placas foram incubadas durante 30 minutos na estufa de CO<sub>2</sub> à 37°C na presença ou ausência dos inibidores das enzimas PI3K, GSK3 e mTOR.

Desta forma, após a incubação, havia poços com as células contendo os inibidores enzimáticos, ou contendo meio de cultura. Em metade dos poços, adicionou-se 20  $\mu$ L de PHA a 1% (Sigma Aldrich Chemicals), e em outra metade adicionou-se 20  $\mu$ L de meio (RPMI completo). Assim, em todos os poços da placa de fundo em U houve uma solução final de 200  $\mu$ L. Finalmente, uma nova incubação em estufa de CO<sub>2</sub> à 37°C foi realizada por um período de 22 horas.

No dia seguinte, exatas 22h após a adição de PHA ou meio, sobrenadantes contendo o que as células produziram após os estímulos foram recolhidos e armazenados a -20°C. A partir dos sobrenadantes recolhidos foram quantificados de citocinas e quimiocinas pelo método de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) e CBA (Cytometric Bead Arrays). Em ambos os métodos, sobrenadantes de culturas de leucócitos foram avaliados, totalizando as 18 condições para cada paciente/controle:

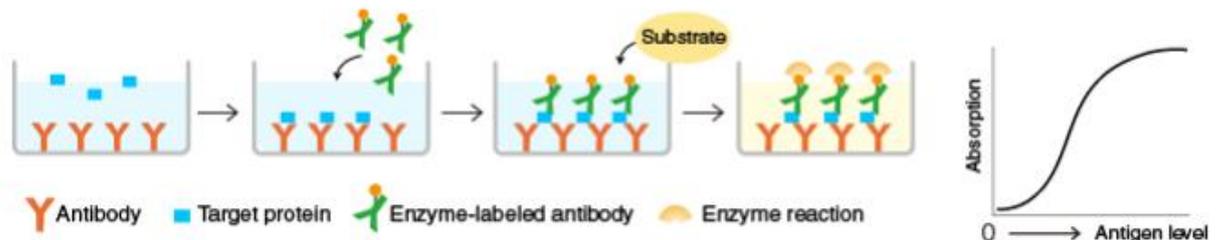
- Sobrenadantes em que leucócitos foram encubados apenas ao meio de cultura;
- Sobrenadantes em que leucócitos foram encubados apenas com o PHA a 1%;
- Sobrenadantes em que leucócitos foram encubados com drogas inibidoras das enzimas PI3K, GSK3 ou mTOR. Foram elas: LY294002 nas concentrações de 10 e 1 microM, AS605240 nas concentrações 0,1 e 1 microM, Rapamicina nas concentrações 2,5 e 0,5 nanoM; CHIR99021 nas concentrações 3 e 1 microM; (ou seja, 4 drogas, em duas concentrações cada) e não foram expostas ao estímulo inflamatório PHA;
- Sobrenadantes em que leucócitos foram encubados as mesmas drogas e concentrações descritas acima, mas foram expostas ao estímulo inflamatório PHA;

## 4.5 Quantificação de citocinas e quimiocinas

### 4.5.1 Quantificação de Citocinas e Quimiocinas pelo ensaio imunoenzimático ELISA

Enquanto um ensaio imunoenzimático colorimétrico indireto, ELISA (**Enzyme-Linked Immunosorbent Assay**) é considerada uma importante técnica para a mensuração de amostras solúveis, especialmente devido à sua grande sensibilidade e especificidade de análise. Desta forma, a quantificação das proteínas inflamatórias humanas IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , e MCP-1 foi realizada através do ELISA de acordo com instruções do fabricante (BD Bioscience, San Diego, CA, USA). Resumidamente, em microplacas de superfície inerte contendo 96 poços foram adicionados anticorpos de captura (Anti-Human IL-10 or IL-6 or TNF- $\alpha$  or MCP-1 monoclonal antibody) diluídos em um tampão de carbonato (Coating Buffer) e incubados overnight a 4°C, processo conhecido como sensibilização. No dia seguinte, placas passaram por um ciclo de 3 lavagens com tampão fosfato-salino (PBS 0,05% + Tween-20), e foram bloqueadas com tampão fosfato-salino + Soro de Albumina Bovina (Assay Diluent) para a ocupação de sítios inespecíficos, evitando assim a geração de resultados falso positivos ou negativos. Tal solução foi incubada a temperatura ambiente por 1 hora. Em seguida, as amostras passaram novamente pelo ciclo de 3 lavagens conforme anteriormente descrito. Posteriormente, nas placas foram pipetadas as diluições seriadas da curva padrão e as amostras (sobrenadantes de culturas de leucócitos). Seguiu-se uma nova incubação por 2 h à temperatura ambiente. Ao término das 2 h, houve novo ciclo de lavagens e adição de anticorpo secundário biotilado com enzima acoplada (Detection Antibody + SAV-HRP reagent) em cada poço, e nova incubação de 1 h. Após novo ciclo de lavagens para a remoção do anticorpo secundário que não se ligou ao anticorpo primário, houve adição da solução de substrato (Tetramethylbenzidine + Peróxido de Hidrogênio), que possui como função ligar-se à enzima previamente adicionada, levando a uma reação enzimática com formação de um produto com cor. Para esta etapa, houve incubação por 30 minutos em temperatura ambiente, sob proteção luminosa para garantir que a reação enzimática ocorra sem interferência luminosa (ver representação esquemática na figura 2 abaixo). A partir da observação da coloração dos padrões, as reações

enzima-substrato foram interrompidas com a adição de Ácido Sulfúrico 1 M (stop solution). Finalmente, as microplacas foram inseridas no leitor de ELISA a 450 nm. Desta forma, a partir da intensidade da cor da superfície dos poços, foi possível a quantificação da concentração dos analitos de interesse (IL-10, IL-6, TNF- $\alpha$ , MCP-1)



**Figura 2:** Representação Esquemática da Técnica de ELISA. Fonte: MBL Life Science. Acesso em fevereiro/2018: <http://ruo.mbl.co.jp/bio/e/support/method/elisa.html>

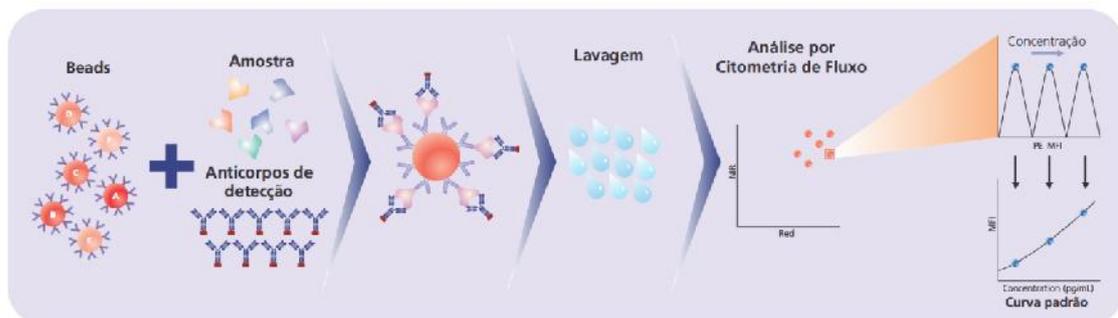
#### 4.5.2 Quantificação de citocinas por imunensaio citométrico com microsferas – Cytometric Bead Arrays (CBA)

Do plasma previamente coletado foram realizadas quantificações de citocinas através do imunensaio direto Cytometric Bead Arrays (CBA), citocinas IL-1 e IL-17A presentes no plasma de pacientes e controles foram quantificadas utilizando-se os kits comerciais BD<sup>TM</sup> CBA Human IL-17A Flex Set e BD<sup>TM</sup> CBA Human IL-1 Flex Set, e realizado conforme instruções do fabricante (BD Bioscience, CBA Flex Set, San Diego, CA, USA). Desta forma, o **CBA Human Soluble Protein Flex Set** utilizado consiste em um kit comercial contendo microsferas de poliestireno (Beads) como suporte sólido para reações de imunofluorescência. Desta forma, beads marcados com diferentes intensidades de fluorescência vermelha são conectadas a anticorpos monoclonais específicos para os analitos de interesse (aqui IL-1 e IL-17A), formando grupamentos com tamanhos, complexidade e intensidade de fluorescência característicos. Tais grupamentos são detectados e analisados através de seus deslocamentos alfa numéricos, posições e fluorescência característicos no citômetro de fluxo, sendo assim possível a revelação da concentração do analito de interesse na amostra. Assim, o CBA é capaz de mesclar as tecnologias do ELISA com as da citometria de fluxo. Adicionalmente, o CBA possui importantes vantagens analíticas, como a detecção rápida e simultânea de proteínas presentes em uma

única amostra, necessidade de pequeno volume de amostra, além de proporcionar alta especificidade, sensibilidade, acurácia e reprodutividade.

Resumidamente, após a preparação e diluição dos componentes do kit exatamente conforme instruções do fabricante, microesferas revestidas com anticorpos de captura específicos para determinado analito e com intensidades diferentes de fluorescência vermelha foram incubados durante 1 h em temperatura ambiente com: proteínas de curva-padrão de concentrações e fluorescência conhecidas, amostra (sobrenadantes da cultura celular e plasma de pacientes e controles), e anticorpos de alta afinidade para a detecção de IL-1 e IL-17A, formando um complexo. Tal complexo foi incubado por 2 h em temperatura ambiente com Ficoeritina (PE), um reagente de detecção colorimétrico, proporcionando específico sinal de fluorescência para cada amostra. Em seguida, o complexo formado em cada poço (microesferas/beads + analito + reagente de detecção) foi lavado com PBS de forma cuidadosa, para a remoção de anticorpos e PE que não se ligaram-se, evitando-se assim valores falso-positivos durante a leitura. Para isto, foi realizada centrifugação (200 rpm, 5 min.) das placas, o sobrenadante foi desprezado, e o precipitado com as microesferas foram ressuspendidos com 200µL de PBS. Finalmente, realizou-se a análise da concentração de citocinas nas amostras através do citômetro de fluxo BD FACS Canto II (Becton & Dickinson, San Jose, CA,USA).

Os resultados obtidos foram analisados pelo FCAP Array™ (BD Bioscience), um software específico para CBA para geração dos resultados no formato tabular e gráfico. As concentrações dos analitos foram expressos em pg/mL. Tanto as dosagens quanto os resultados obtidos encontram-se armazenados nos computadores do LIIM. A figura 3 abaixo ilustra a representação esquemática da metodologia aqui descrita para a obtenção dos resultados.



**Figura 3:** Representação Esquemática da Técnica de CBA. Fonte: Aplicações da Citometria de Fluxo – BD Bioscience. Acesso em fevereiro/2018:

[http://www.bdbiosciences.com/br/documents/Aplicacoes\\_Citometria.pdf](http://www.bdbiosciences.com/br/documents/Aplicacoes_Citometria.pdf)

## 5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise estatística foram ajustados modelos mixtos lineares com a função lme do pacote nlme do programa R (versão 3.4.4). Inicialmente, a fim de responder se há diferença de resposta média para um individuo após tratamentos diferentes Anovas seguidos de teste de posthoc Tukey foram computadas a partir do ajuste do modelo. Em seguida, a fim de responder se há diferença de resposta média para um mesmo estímulo entre indivíduos com esquizofrenia (SCZ) e controles foram realizados Testes de Wilcoxon para amostras pareadas em cada condição experimental. Em todas as análises o nível de significância estabelecido foi de  $p < 0,05$ .

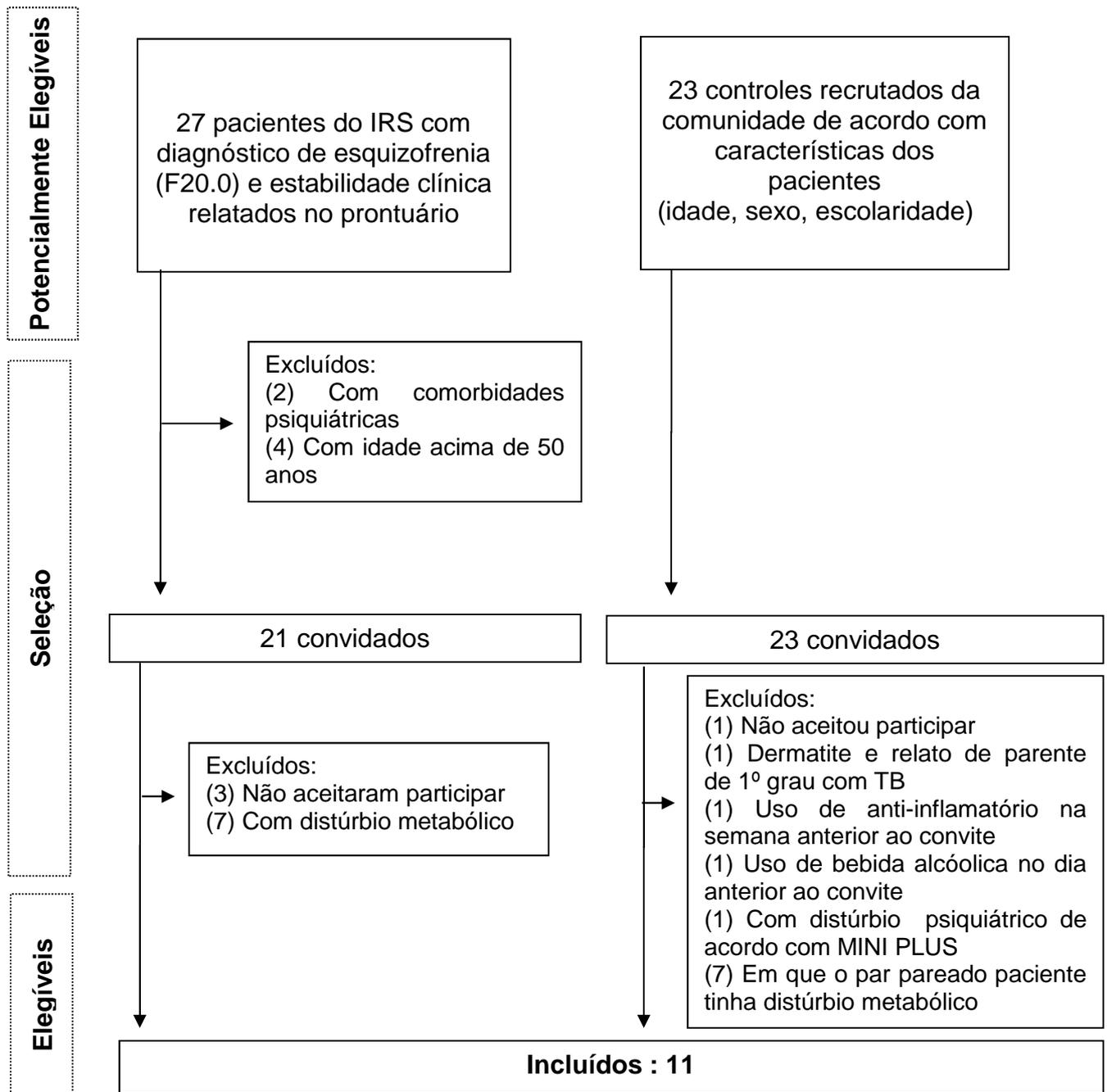
## 6 RESULTADOS

Foram inicialmente avaliados enquanto potenciais participantes da pesquisa 27 pacientes do IRS com diagnóstico de esquizofrenia (F20.0) e estabilidade clínica relatada no prontuário e pelos residentes de psiquiatria. Destes, foram excluídos a partir de análise prévia de prontuários (4) pacientes com idade acima de 50 anos e (2) com comorbidades psiquiátricas (fobia social e transtorno dismórfico corporal; agorafobia atual e vida inteira). Desta forma, 21 pacientes foram convidados a participar desta pesquisa. Destes, três (3) não aceitaram participar da pesquisa, e sete (7) foram excluídos da pesquisa devido à distúrbio metabólico detectado através de dados clínico-antropométricos e laboratoriais. Assim, dos 21 pacientes do IRS convidados a participar da pesquisa, apenas 11 preencheram todos os critérios de inclusão e foram incluídos na pesquisa.

Os indivíduos controles foram recrutados da comunidade. Foram inicialmente avaliados enquanto potenciais participantes da pesquisa e convidados a participar 23 controles, selecionados para o pareamento com os pacientes de acordo com características de sexo, idade e escolaridade. Dos 23 controles convidados a participar da pesquisa, 5 foram excluídos da pesquisa devido à: (1) não aceitou participar da pesquisa por medo da punção venosa, (1) relato de dermatite e parente de primeiro grau (pai) com distúrbio psiquiátrico (transtorno bipolar), (1) uso de anti-inflamatório na semana anterior ao convite para participar da pesquisa, e (1) uso de bebida alcoólica no dia anterior ao convite para participar da pesquisa, (1) com distúrbio psiquiátrico de acordo com MINI PLUS (episódio depressivo maior com características melancólicas e risco de suicídio atual alto) e (7) que o seu par paciente apresentou distúrbio metabólico. Assim, 11 controles recrutados da comunidade foram incluídos na pesquisa.

É importante frisar que a seleção dos controles participantes desta pesquisa não ocorreu de acordo com aleatoriedade, ou seja, foram convidados a participar da pesquisa controles de acordo com características de sexo, idade e escolaridade pareados com os pacientes, a fim de obtermos sucesso no pareamento 1:1.

Abaixo vemos uma representação esquemática em forma de fluxograma da seleção de pacientes e controles saudáveis incluídos neste trabalho



**Figura 4.** Fluxograma da Seleção de Pacientes e Controles.

### 6.1 Características Clínicas e Sócio-demográficas de Pacientes e Controles

Na tabela abaixo podemos esquematicamente observar as características clínicas e sócio- demográficas coletadas de pacientes e controles incluídos na pesquisa.

**Tabela 1 - Características Clínicas e Sócio-demográficas da Amostra Incluída**

	<b>Pacientes com Esquizofrenia (n=11)</b>	<b>Controles Saudáveis (n=11)</b>
<b>Gênero</b>		
Homens	7	7
Mulheres	4	4
<b>Idade Média (anos)</b>	34,545	34,090
<b>Anos de estudo (média)</b>	7,818	8,636
<b>Anos de repetência escolar (média)</b>	1,363	0,727
<b>Idade de início da doença (média)</b>	21,6	NA
<b>Idade de início do tratamento (média)</b>	23,545	NA
<b>Número de surtos ao longo da vida (média)</b>	3,777	NA
<b>PANSS total (média)</b>	65,363	NA
<b>Presença de comorbidades psiquiátricas (Avaliação Mini-Plus)</b>		
Sim	0	0
Não	11	11
<b>Relato de distúrbios psiquiátricos em parentes de primeiro grau</b>		
Sim	9	0
Não	1	11
<b>Cor auto-declarada</b>		
Branco	2	2
Negro	2	1
Pardo	7	8
<b>TGO (U/L - média)</b>	21,70	37,462

<b>TGP (U/L - média)</b>	27,821	20,291
<b>Colesterol total (média)</b>	177,849	195,408
<b>IMC (média)</b>	25,92	25,027
<b>Indicadores de Estresse Crônico</b>		
<b>Filhos</b>		
Sim	4	6
Não	7	5
<b>Situação Trabalhista</b>		
Desempregado	5	0
Empregado registrado	0	9
Empregado não registrado	2	1
Estudante	0	1
Aposentado	4	0
<b>Situação Previdenciária</b>		
Aposentadoria	4	NA
Auxílio-doença	2	NA
Sem benefício	5	NA
<b>Estado Civil</b>		
Casado	2	6
Solteiro	9	3
Divorciado	0	2
<b>Uso Atual de substâncias</b>		
Álcool	1	3
Tabaco	4	0
Maconha	1	0
Cocaína/crack	0	0
Outros	0	0
<b>Uso Pgresso de substâncias</b>		
Álcool	10	2
Tabaco	6	0
Maconha	7	0
Cocaína/crack	5	0
Outros	0	0
<b>Reside</b>		
Sozinho	0	3
Com familiares (pai, mãe e/ou irmão(s))	9	2
Com cônjuge	0	1
Com conjuge e filho(s)	2	5

<b>Religião</b>		
Nenhuma	3	0
Umbanda	1	0
Católico/Cristão	3	10
Protestante	1	0
Evangélico	2	1
Testemunha de Jeová	1	0

<b>Indicadores de Distúrbio metabólico</b>		
Pressão arterial sistólica (PAS) (média)	119,727	113,181
Pressão arterial diastólica (PAD) (média)	77,909	72,545
Circunferência Abdominal (cm - média)	88,818	85,727
Glicemia capilar pós-prandial mg/dL (média)	98,909	101,909
Triglicérides	195,818	167,404
Presença de Síndrome metabólica	Não	Não

NA = Não aplica

## **6.2 Mundo Real x Mundo Experimental Ideal: Medicamentos em Uso por Pacientes para a Estabilização Clínica**

Outro fator de crucial importância foi a observação de quais medicamentos os pacientes e controles estavam em uso no momento da coleta de sangue periférico, uma vez que, conforme vimos anteriormente, alguns destes medicamentos vêm sendo descritos em alguns trabalhos enquanto fármacos com ação direta ou indireta na via celular PI3K/AKT/GSK3/mTOR. Apesar disto, o uso de um ou mais medicamentos psiquiátricos na amostra selecionada (pacientes com esquizofrenia e estáveis clinicamente) era esperado, especialmente pelo fato dos pacientes do IRS possuírem, em sua maioria, como perfil: pacientes crônicos, resistentes aos tratamentos convencionais e ao uso de politerapia medicamentosa.

Assim, decidimos retratar neste trabalho a realidade da politerapia tão comum nos pacientes com esquizofrenia e ao “mundo real”. Conforme podemos observar na tabela 2, quase todos os pacientes que preencheram os critérios de inclusão deste trabalho estão em politerapia. Adicionalmente, observamos um arsenal terapêutico muito heterogêneo ao compararmos os pacientes com esquizofrenia. Já em relação aos controles, nenhum dos controles incluídos neste trabalho estavam ao uso de medicamento(s) no momento da coleta do sangue periférico.

**Tabela 2.** Relação de Pacientes e Medicamento(s) em Uso no Momento da Coleta do Sangue Periférico

Paciente	Sexo	Medicamento(s) em uso na data da coleta de sangue periférico
P1	F	Trifluoperazina 5 mg (0+0+1)
P2	M	Clozapina 200 mg/dia, Clonazepam 2 mg/dia, Haloperidol 15 mg/dia, Fluoxetina 60 mg/dia, Levotiroxina 50 mcg/dia, (Paracetamol 500 mg e Omeprazol 20 mg quando necessário)
P3	M	Olanzapina 10 mg (1+0+2), Haloperidol 5 mg (1+0+2), Clorpromazina (100 mg (0+0+1), Biperideno 2 mg (1+0+0), Fenofibrato 200 mg (0+1+0)
P4	F	Risperidona 3 mg (1+0+1), Clonazepam 2,5 mg/mL (15 gotas a noite), Clorpromazina 40 mg/mL (10 gotas a noite), Fluoxetina 20 mg (1+0+0)
P5	M	Haloperidol 5 mg (0+0+1), Fluoxetina 20 mg (2+0+0), Olanzapina 10 mg (0+0+2), Clonazepam 2,5 mg/mL (5 gotas em caso de insônia)
P6	M	Risperidona 4 mg (0+0+1), Clonazepam 2,5 mg/mL (5 gotas a noite)
P7	F	Clozapina 100 mg, Imipramina 25 mg
P8	M	Clozapina 100 mg (2+0+3), Prometazina 25 mg (0+0+2), Haloperidol 5 mg (1+0+1), Biperideno 2 mg (1+0+0) , Ácido Valpróico 250 mg (3+0+2)
P9	M	Olanzapina 15 mg (0+0+1), Diazepan 10 mg (0+0+1 se necesssário)
P10	M	Clorpromazina 25 mg (1+0+1), Clonazepam 2,5 mg/mL (1+0+1), Haloperidol 5 mg (0+0+1)
P11	F	Fluoxetina 20 mg (1+0+0), Halopedidol 5 mg (0+0+3), Carbamazepina 200 mg (1+1+1), Clonapezam 2 mg (0+0+1)

Legenda: P = Paciente, F = Feminino, M = Masculino

Adicionalmente, os fármacos mais frequentemente utilizados pelos pacientes incluídos nesta pesquisa foram o haloperidol e o clonazepam, conforme podemos visualizar na tabela 3 abaixo:

**Tabela 3.** n de Pacientes ao uso de Fármacos Antipsicóticos, Benzodiazepínicos e Antidepressivos no Momento da Coleta do Sangue Periférico

<b>Fármaco</b>	<b>n de pacientes em uso</b>
<b>Antipsicóticos de 1ª geração</b>	
Clorpromazina	3
Trifluoperazina	1
Haloperidol	6
<b>Antipsicóticos de 2ª geração</b>	
Olanzapina	3
Risperidona	2
Clozapina	3
<b>Ao uso de Benzodiazepínicos</b>	
Clonazepam/Diazepam	7
<b>Ao uso de antidepressivos</b>	
Fluoxetina	4
Imipramina	1

A seguir temos gráficos que expressam 2 comparações estatísticas: **i)** a resposta média de produção de IL-10, MCP-1, IL-17A, IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , para um grupo de indivíduos após tratamentos diferentes (dados estatísticos detalhados em **APÊNDICE E**), **ii)** a comparação estatística da resposta média de tais mediadores inflamatórios produzidas por CMSP de pacientes com esquizofrenia em relação a controles frente um mesmo estímulo (dados estatísticos detalhados em **APÊNDICE F**). É importante frisar que em todas as condições CMSP de pacientes com esquizofrenia e controles estavam em mesma concentração aproximada de  $1 \times 10^7$  CMSP/mL de meio. Conforme veremos adiante, tal fato impacta diretamente na interpretação dos resultados.

### 6.3 Quantificacao de IL-10

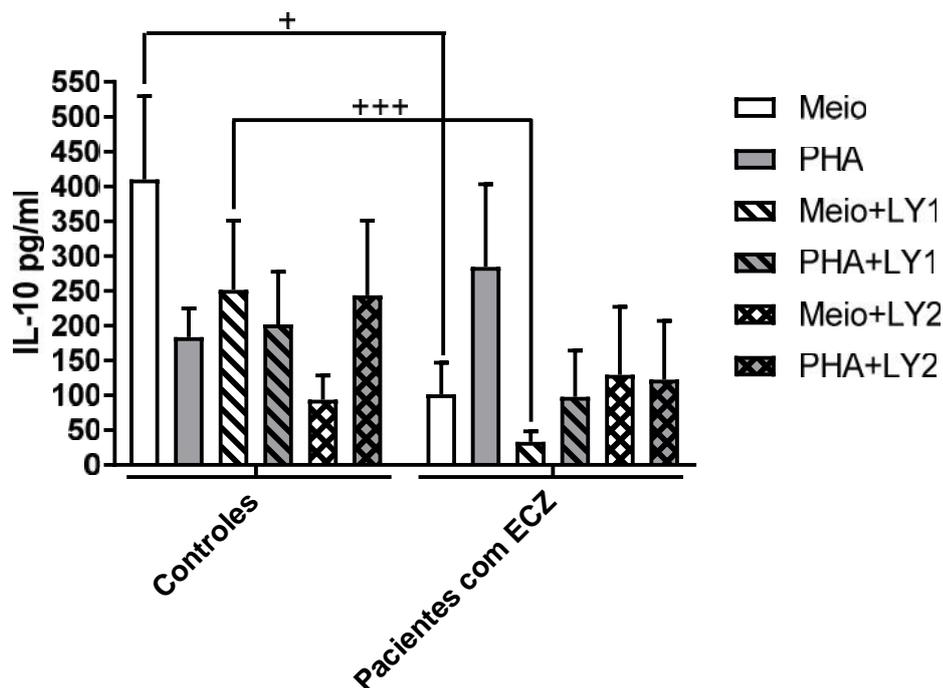
#### 6.3.1 Avaliação do efeito dos inibidores de PI3K sobre a produção de IL-10 por CMSP de pacientes com esquizofrenia e controles

Observamos um padrão de resposta visualmente diferente da produção da citocina anti-inflamatória IL-10 basal por CMSP de controles e pacientes. Interessantemente, enquanto níveis basais de citocinas produzidas por CMSP de controles possuem um valor em torno de 400 pg/ml, com decréscimo deste nível mediante à exposição ao estímulo inflamatório PHA, nos pacientes podemos visualizar exatamente um padrão inverso desta resposta. Neste sentido, no grupo pacientes foi observado menores níveis de IL-10 em sobrenadantes de células expostas ao meio de cultura com aumento deste nível mediante à exposição ao PHA1%. Ou seja, um padrão inverso de níveis basais de IL-10 bem como de produção de IL-10 mediante a um estímulo inflamatório com PHA 1% (figuras 5, 6,7,8)

Inicialmente foi realizada análise estatística para a avaliação da produção da citocina anti-inflamatória IL-10 por CMSP de um indivíduo/grupo exposto a diferentes condições experimentais (ver **APÊNDICE E**). Apesar de visualmente podermos observar variações na produção de IL-10 mediante a diferentes estímulos, a exposição de células ao LY294002 na concentração de 10  $\mu$ M (grupo Meio + LY1) ou 1  $\mu$ M (grupo Meio + LY2) não alterou de forma significativa a produção de IL-10 em CMSP de controles ou de pacientes com esquizofrenia em relação às células expostas apenas ao meio de cultura (Meio) ( $p > 0,05$ ; Fig. 5). Da mesma forma, em células incubadas inicialmente com LY294002 (10 ou 1  $\mu$ M) e em seguida expostas ao PHA 1% por 22h (grupos PHA+LY1; PHA+LY2 respectivamente) não observamos alteração significativa a produção de IL-10 em CMSP de pacientes com esquizofrenia ou de controles em relação às células expostas apenas ao meio de cultura (grupo Meio) ou ao PHA 1% (grupo PHA) ( $p > 0,05$ ; Fig. 5).

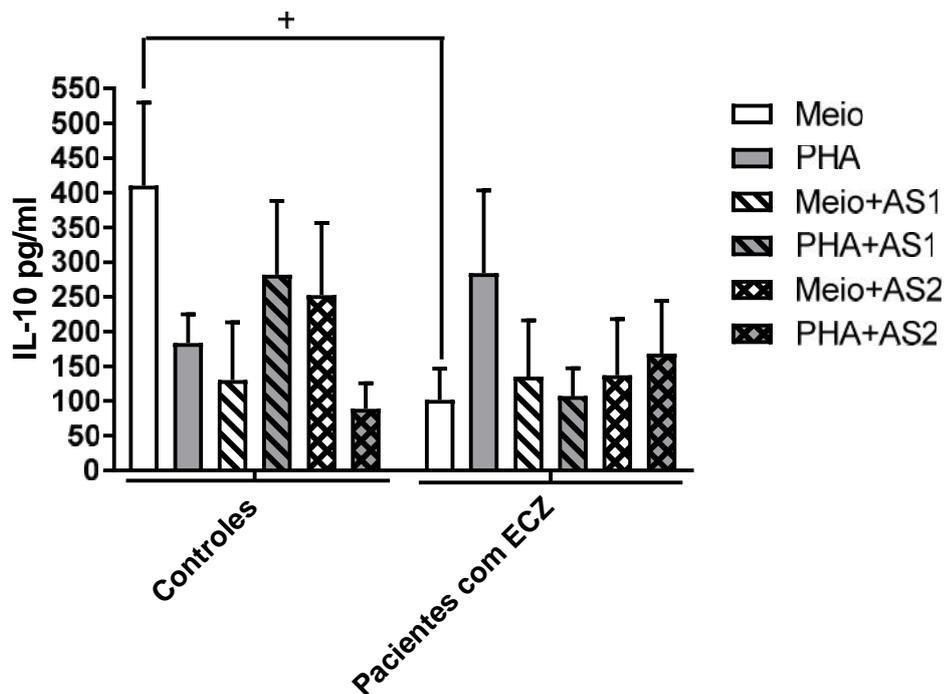
Já na comparação estatística entre o grupo de pacientes com esquizofrenia e o de controles expostos a mesma condição experimental (ver **APÊNDICE F**), ao analisarmos a resposta de células expostas apenas ao meio de cultura por 22h, observamos menores níveis basais de IL-10 no sobrenadante das culturas de

células de pacientes com esquizofrenia em relação a controles (Fig. 5,6,7,8;  $p < 0,05$ ). Já mediante à estimulação com PHA1%, níveis de IL-10 no sobrenadante de células de pacientes com esquizofrenia e controles não diferem estatisticamente, apesar da tendência não significativa ( $p > 0,05$ ), observamos maiores níveis de IL-10 no sobrenadante de células de pacientes em relação aos controles (Fig. 5,6,7,8). Adicionalmente, mediante à exposição do inibidor de PI3K com LY294002 em concentração 1 (LY1), CMSP de pacientes produzem menor quantidade significativa de IL-10 ( $p = 0,007$ ) em relação à CMSP de controles frente a mesma exposição (Fig. 5). Também podemos observar na figura abaixo uma tendência não significativa à maior produção basal de PHA por CMSP de pacientes em comparação às CMSP de controles bem como uma tendência (não significativa,  $p > 0,05$ ) à menor produção de IL-10 por CMSP de pacientes expostas à PHA + LY294002 em concentração 1 (LY1), LY294002 em concentração 2 (LY2) e PHA + LY2, em comparação à CMSP de controles sob a mesma exposição.



**Figura 5:** Avaliação do efeito de um inibidor de todas as isoformas de PI3K (LY294002) sobre a produção de IL-10 em cultura de CMSP. Células de pacientes com esquizofrenia ou controles na concentração aproximada de  $1 \times 10^7$  células/mL foram incubadas com LY294002 (1 ou 10  $\mu$ M, -30min.) e estimuladas ou não com PHA (1%) por 22h.  $^+p < 0,05$  e  $^{+++}p < 0,001$ .

Com o objetivo de se investigar o efeito da inibição apenas da isoforma  $\beta$  de PI3K, utilizou-se o inibidor seletivo AS605240. De modo semelhante ao inibidor não seletivo, o AS605240 na concentração de 1  $\mu$ M (AS1) ou 0,1  $\mu$ M (AS2) não alterou significativamente os níveis de IL-10 em CMSP estimuladas com PHA ou não, em indivíduos controles e em pacientes com esquizofrenia (Fig. 6,  $p > 0,05$ ).

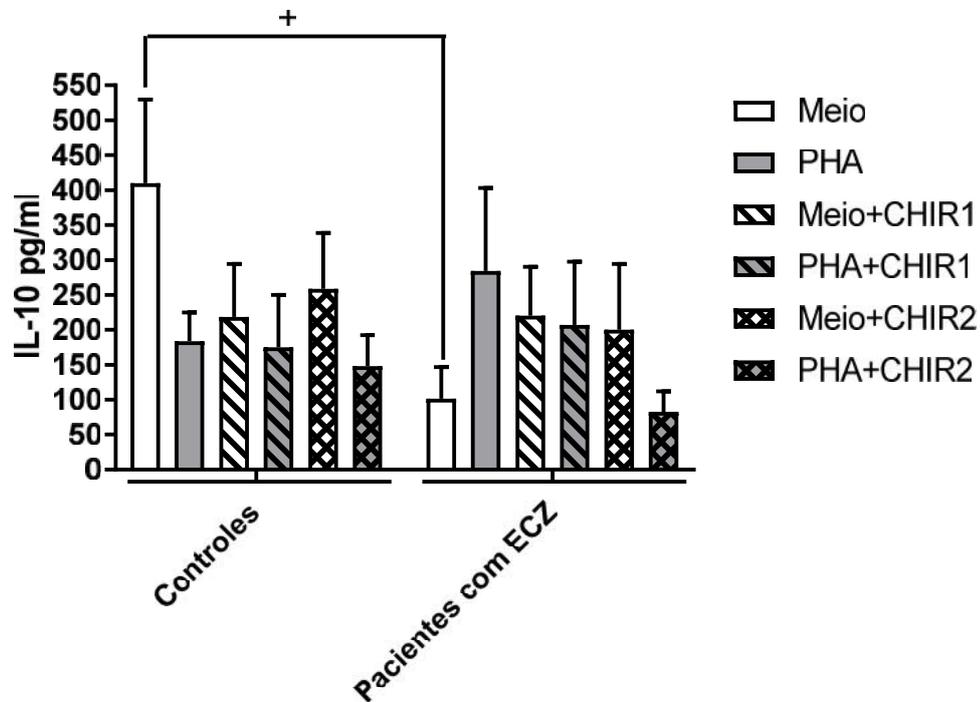


**Figura 6:** Avaliação do efeito de um inibidor seletivo de PI3K (AS605240) sobre a produção de IL-10 em cultura de CMSP. Células de pacientes com esquizofrenia ou controles na concentração aproximada de  $1 \times 10^7$  células/mL foram incubadas com AS605240 (0,1 ou 1  $\mu$ M, -30min.) e estimuladas ou não com PHA (1%) por 22h.  $^+p < 0,05$

### 6.3.2 Avaliação do efeito do inibidor de GSK3 sobre a produção de IL-10 por CMSP de pacientes com esquizofrenia e controles

A seguir foi avaliado se a inibição seletiva de GSK3  $\beta$ , via CHIR99021, alteraria a produção de IL-10 por células de controles e de pacientes com esquizofrenia estimuladas ou não com PHA 1%. A exposição de células não estimuladas a CHIR99021 na concentração 3  $\mu$ M (CHIR1) ou 1  $\mu$ M (CHIR2) não alterou significativamente a produção de IL-10 por CMSP de pacientes com esquizofrenia e

controles. De forma semelhante, CHIR99021 também não alterou a produção de IL-10 em CMSP de ambos os grupos estimuladas com PHA ( $p > 0,05$ ; Fig. 7)

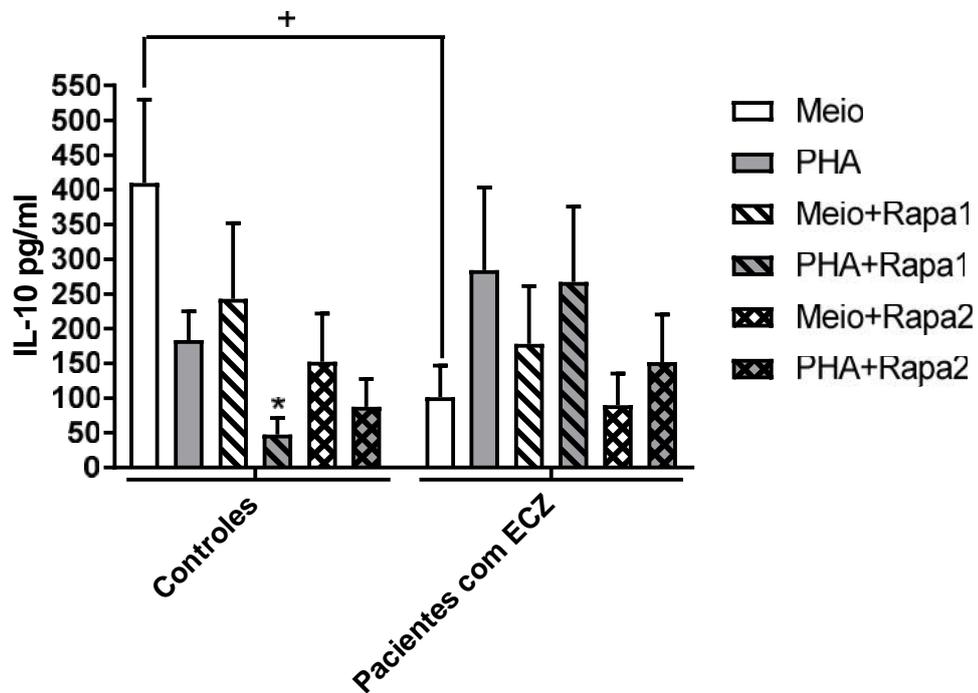


**Figura 7:** Avaliação do efeito de um inibidor de GSK3 (CHIR99021) sobre a produção de IL-10 em cultura de CMSP. Células de pacientes com esquizofrenia ou controles na concentração aproximada de  $1 \times 10^7$  células/mL foram incubadas com CHIR99021 (1 ou 3  $\mu$ M, -30min.) e estimuladas ou não com PHA (1%) por 22h.  $^+p < 0,05$ .

### 6.3.3 Avaliação do efeito do inibidor de mTOR sobre a produção de IL-10 por CMSP de pacientes com esquizofrenia e controles

Por fim foi avaliado se a inibição de mTOR, via rapamicina, alteraria a produção de IL-10 por células de controles e de pacientes com esquizofrenia, estimuladas ou não com PHA 1%. A exposição de células não estimuladas com a rapamicina na concentração 2,5 nM (Rapa1) ou 0,5 nM (Rapa2) não alterou significativamente a produção de IL-10 por CMSP de pacientes e controles em relação ao meio de cultura ( $p > 0,05$ ). Observa-se que a rapamicina diminuiu significativamente a produção da citocina anti-inflamatória IL-10 em CMSP de indivíduos controles estimuladas com PHA ( $p < 0,05$ ; Fig. 8). O mesmo não se observou em CMSP de

pacientes com esquizofrenia estimuladas com PHA ( $p > 0,05$ ; Fig. 8), demonstrando uma resposta diferencial de CMSP de pacientes e controles.



**Figura 8:** Avaliação do efeito de um inibidor de mTOR (rapamicina) sobre a produção de IL-10 em cultura de CMSP. Células de pacientes com esquizofrenia ou controles na concentração aproximada de  $1 \times 10^7$  células/mL foram incubadas com rapamicina (0,5 ou 2,5 nM, -30min.) e estimuladas ou não com PHA (1%) por 22h.  $^{\dagger}p < 0,05$ ;  $*p < 0,05$  em relação ao grupo meio de cultura.

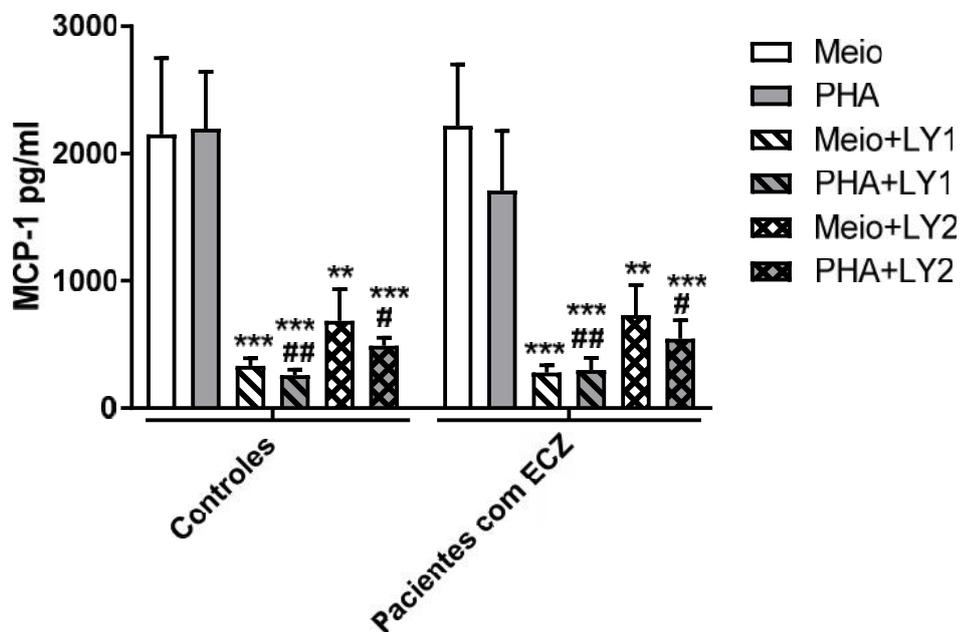
Assim, de um modo geral, podemos concluir sobre a IL-10 que uma mesma concentração aproximada de CMSP de pacientes com esquizofrenia produzem menor quantidade significativa de IL-10 basal em comparação a controles. Também observamos que as quatro drogas testadas falham no aumento desta citocina anti-inflamatória produzida por CMSP estimuladas com PHA ou não, em indivíduos controles e em pacientes com esquizofrenia.

## 6.4 Quantificacao de MCP-1

### 6.4.1 Avaliação do efeito dos inibidores de PI3K sobre a produção de MCP-1 por CMSP de pacientes com esquizofrenia e controles

Inicialmente observou-se que os níveis basais de MCP-1 no sobrenadante das culturas de células não estimuladas de controles e de pacientes com esquizofrenia são similares e não diferem estatisticamente. Da mesma forma, a estimulação com PHA não aumenta os níveis de MCP-1 quantificados no sobrenadante das culturas de células de controles nem de pacientes com esquizofrenia (Fig. 9,10,11,12).

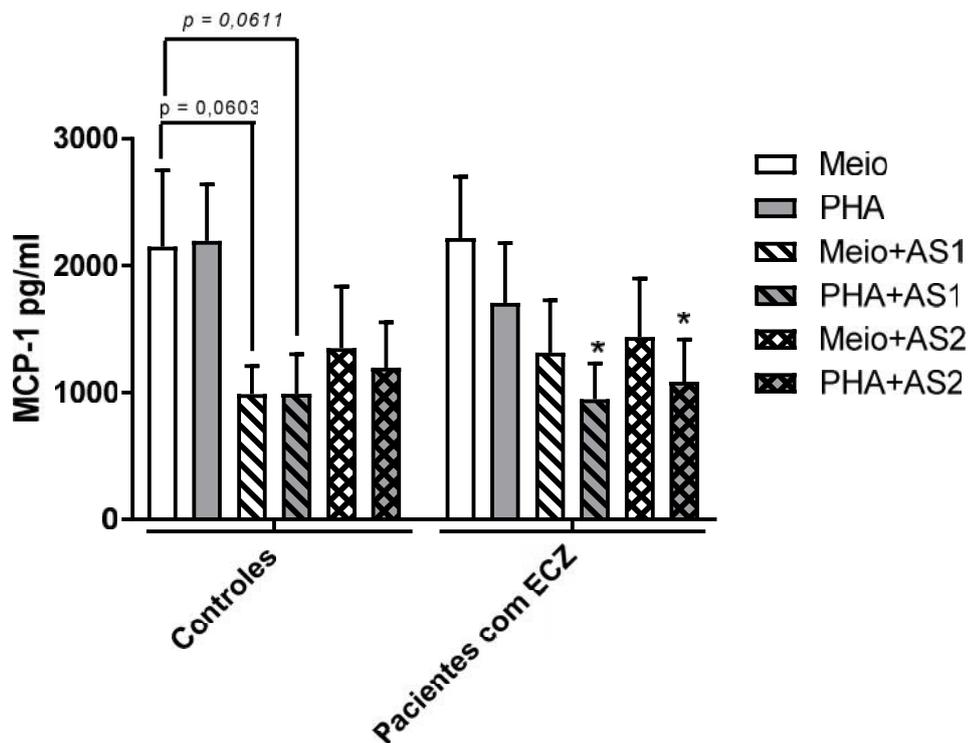
Já a exposição de células não estimuladas e estimuladas com PHA ao LY294002 (1 ou 10  $\mu$ M) em ambas as concentrações, são capazes de diminuir a produção da citocina pró-inflamatória MCP-1 por CMSP obtidas de controles e de pacientes com esquizofrenia (Fig. 9,  $p < 0,05$ ).



**Figura 9:** Avaliação do efeito de um inibidor de todas as isoformas de PI3K (LY294002) sobre a produção de MCP-1 em cultura de CMSP. Células de pacientes com esquizofrenia ou controles na concentração aproximada de  $1 \times 10^7$  células/mL foram incubadas com LY294002 (1 ou 10  $\mu$ M, -30min.) e estimuladas ou não com

PHA (1%) por 22h. \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  em relação ao grupo meio; ## $p < 0,01$  e ### $p < 0,001$  em relação ao grupo PHA.

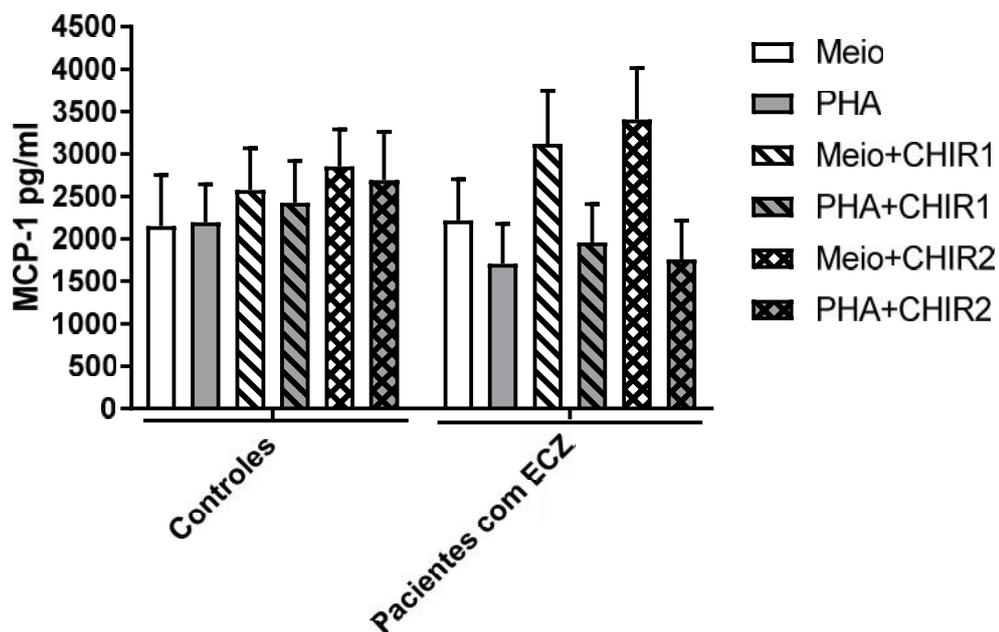
De modo semelhante ao inibidor não seletivo, o AS605240 (0,1 ou 1  $\mu\text{M}$ ), em ambas as concentrações, levou à diminuição dos níveis de MCP-1 no sobrenadante de células de pacientes com esquizofrenia incubadas com PHA ( $p < 0,05$ ; Fig.10). No entanto, AS605240 (0,1 ou 1  $\mu\text{M}$ ) falhou na diminuição dos níveis de MCP-1 por CMSP de pacientes incubadas apenas com o meio. Já em relação aos controles, AS605240 (0,1 ou 1  $\mu\text{M}$ ), em ambas as concentrações, não levou à diminuição dos níveis de MCP-1 no sobrenadante de células de incubadas ou não com PHA ( $p > 0,05$ ; Fig. 10).



**Figura 10:** Avaliação do efeito de um inibidor seletivo de PI3K (AS605240) sobre a produção de MCP-1 em cultura de CMSP. Células de pacientes com esquizofrenia ou controles na concentração aproximada de  $1 \times 10^7$  células/mL foram incubadas com LY294002 (1 ou 10  $\mu\text{M}$ , -30min.) e estimuladas ou não com PHA (1%) por 22h. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo meio de cultura.

#### 6.4.2 Avaliação do efeito do inibidor de GSK3 sobre a produção de MCP-1 por CMSP de pacientes com esquizofrenia e controles

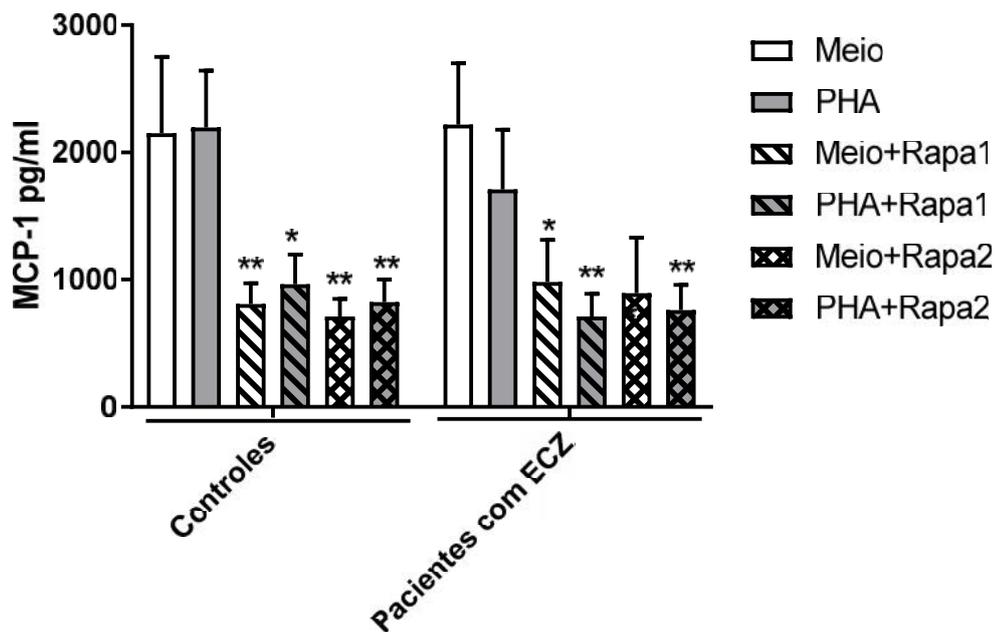
A exposição a células não estimuladas ao CHIR99021 nas doses 1 ou 3  $\mu\text{M}$  não alterou a produção de MCP-1 por CMSP de controles e pacientes. Da mesma forma, a exposição a células estimuladas com PHA ao CHIR99021 em ambas as doses também não alterou a produção de MCP-1 por CMSP de controles e de pacientes ( $p > 0,05$ ; Fig. 11).



**Figura 11:** Avaliação do efeito de um inibidor de GSK3 (CHIR99021) sobre a produção de MCP-1 em cultura de CMSP. Células de pacientes com esquizofrenia ou controles na concentração aproximada de  $1 \times 10^7$  células/mL foram incubadas com CHIR99021 (1 ou 3  $\mu\text{M}$ ; -30min.) e estimuladas ou não com PHA (1%) por 22h.

#### 6.4.3 Avaliação do efeito do inibidor de mTOR sobre a produção de MCP-1 por CMSP de pacientes com esquizofrenia e controles

De modo semelhante ao inibidor de PI3K, a exposição de células não estimuladas e estimuladas com PHA ao inibidor de mTOR rapamicina (0,5 ou 2,5 nM) diminuiu a produção de MCP-1, em ambas as concentrações, em CMSP obtidas de controles e de pacientes com esquizofrenia ( $p < 0,05$ ; Fig. 12)



**Figura 12:** Avaliação do efeito de um inibidor de mTOR (rapamicina) sobre a produção de MCP-1 em cultura de CMSP. Células de pacientes com esquizofrenia ou controles na concentração aproximada de  $1 \times 10^7$  células/mL foram incubadas com rapamicina (0,5 ou 2,5 nM, -30min.) e estimuladas ou não com PHA (1%) por 22h. \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$  em relação ao grupo meio de cultura.

Assim, de um modo geral, podemos concluir sobre a MCP-1 que uma mesma concentração aproximada de CMSP de pacientes com esquizofrenia produzem quantidade similar de MCP-1 basal em comparação a controles. Também observamos que ao inibidor não seletivo de PI3K (LY294002, 1 ou 10  $\mu\text{M}$ ) e ao inibidor de mTOR (rapamicina 0,5 ou 2,5 nM) são capazes de diminuir os níveis desta citocina pró-inflamatória produzida por CMSP obtidas de controles e de pacientes com esquizofrenia, tratadas ou não com estímulo inflamatório. Já o inibidor seletivo PI3K (AS605240, 0,1 ou 1  $\mu\text{M}$ ), levou à diminuição dos níveis de MCP-1 no sobrenadante de células apenas de pacientes com esquizofrenia e incubadas com PHA.

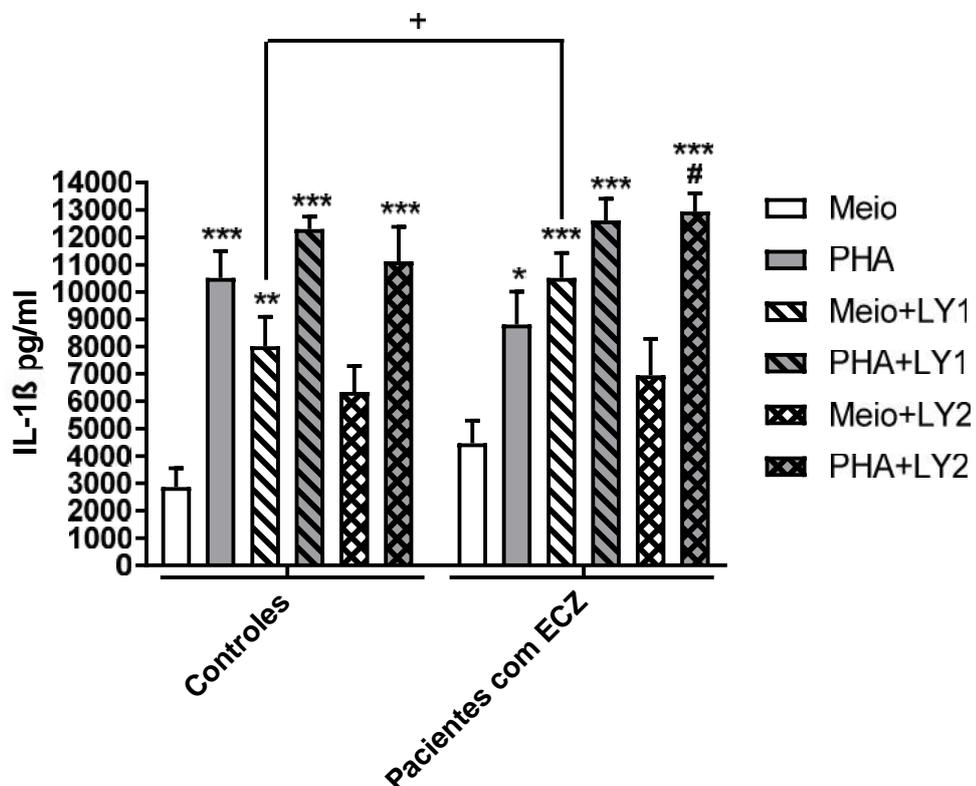
Também observamos que das quatro drogas testadas, o inibidor de GSK3 (CHIR99021, 1 ou 3  $\mu\text{M}$ ), nas duas concentrações, falhou na redução dos níveis de MCP-1 em CMSP de controles e de pacientes com esquizofrenia, tratadas ou não com estímulo inflamatório.

## 6.5 Quantificação de IL-1

### 6.5.1 Avaliação do efeito dos inibidores de PI3K, mTOR e de GSK3 sobre a produção de IL-1 por CMSP de pacientes com esquizofrenia e controles

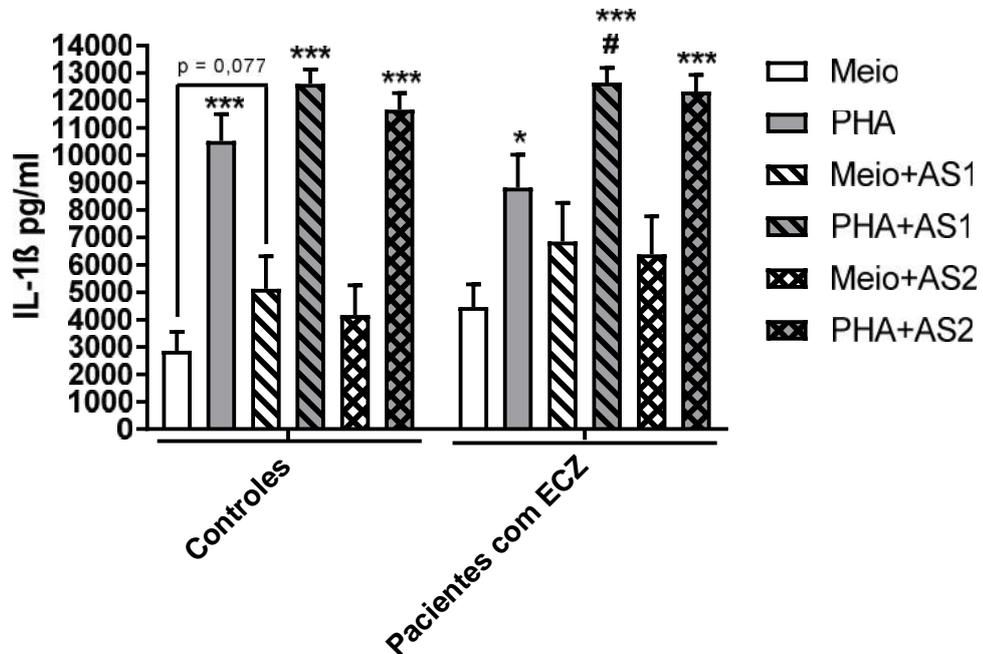
Observa-se que os níveis basais de IL-1 no sobrenadante das culturas de células não estimuladas de pacientes com esquizofrenia e controles não diferem. No entanto, a estimulação com PHA aumenta os níveis de IL-1 no sobrenadante das culturas de células de controles e de pacientes com esquizofrenia (Fig. 13,14,15,16).

Já a exposição de células não estimuladas e estimuladas com PHA ao LY294002 (1 ou 10  $\mu$ M) aumenta de forma significativa a produção de IL-1 em CMSP obtidas de pacientes com esquizofrenia e de controles em comparação às células expostas apenas ao meio ( $p < 0,05$ ; Fig. 13). Adicionalmente, CMSP de pacientes produzem significativamente maior quantidade de IL-1 ( $p = 0,032$ ) em relação a CMSP de controles frente a mesma exposição (Meio + LY1).

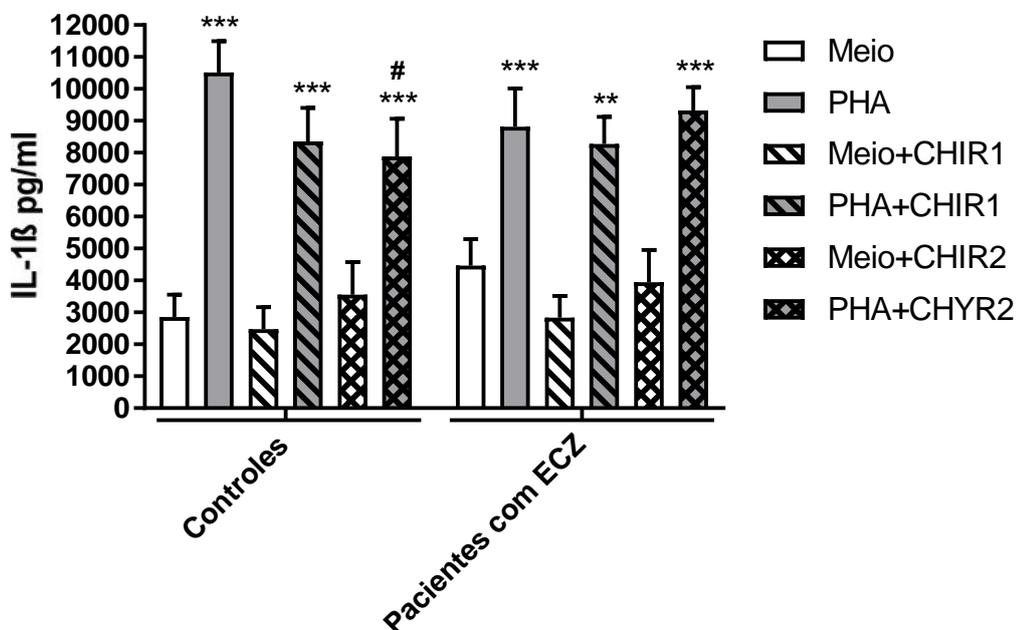


**Figura 13:** Avaliação do efeito de um inibidor de todas as isoformas de PI3K (LY294002) sobre a produção de IL-1 em cultura de CMSP. Células de pacientes

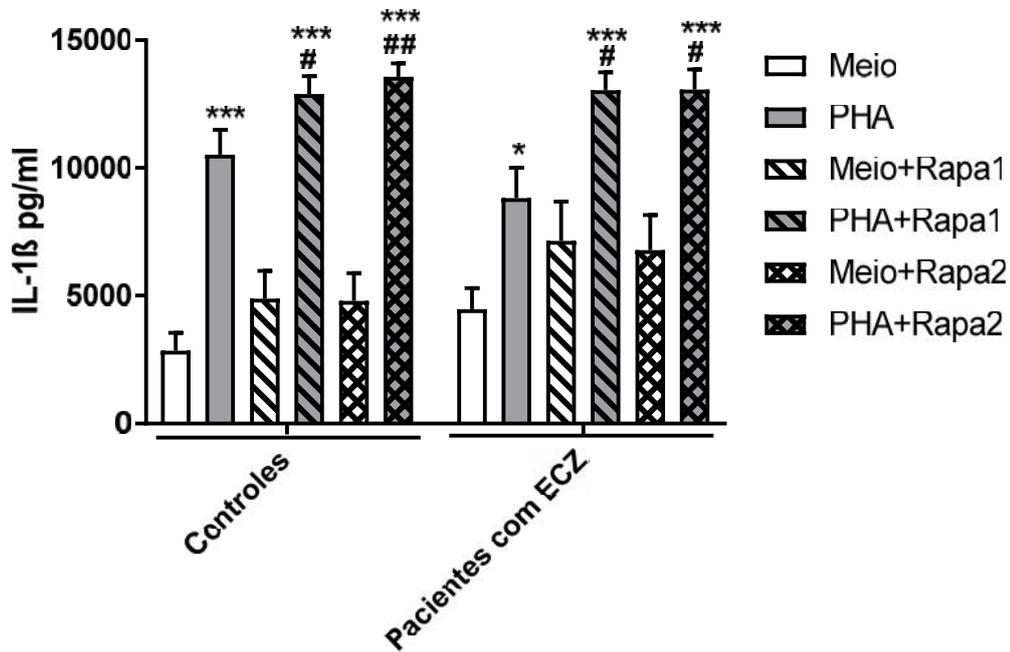
com esquizofrenia ou controles na concentração aproximada de  $1 \times 10^7$  células/mL foram incubadas com LY294002 (1 ou 10  $\mu$ M, -30min.) e estimuladas ou não com PHA (1%) por 22h.  $^+p < 0,05$ ;  $^*p < 0,05$ ;  $^{**}p < 0,01$  e  $^{***}p < 0,001$  em relação ao grupo meio de cultura;  $^{##}p < 0,01$  em relação ao grupo PHA.



**Figura 14:** Avaliação do efeito de um inibidor seletivo de PI3K (AS605240) sobre a produção de IL-1 em cultura de CMSP. Células de pacientes com esquizofrenia ou controles na concentração aproximada de  $1 \times 10^7$  células/mL foram incubadas com AS605240 (0,1 ou 1  $\mu$ M, -30min.) e estimuladas ou não com PHA (1%) por 22h.  $^*p < 0,05$  e  $^{***}p < 0,001$  em relação ao grupo meio de cultura;  $^{##}p < 0,01$  em relação ao grupo PHA.



**Figura 15:** Avaliação do efeito de um inibidor de GSK3 (CHIR99021) sobre a produção de IL-1 em cultura de CMSP. Células de pacientes com esquizofrenia ou controles na concentração aproximada de  $1 \times 10^7$  células/mL foram incubadas com CHIR99021 (1 ou 3  $\mu$ M, -30min.) e estimuladas ou não com PHA (1%) por 22h. \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  em relação ao grupo meio de cultura; ## $p < 0,01$  em relação ao grupo PHA.



**Figura 16:** Avaliação do efeito de um inibidor de mTOR (rapamicina) sobre a produção de IL-1 em cultura de CMSP. Células de pacientes com esquizofrenia ou controles na concentração aproximada de  $1 \times 10^7$  células/mL foram incubadas com rapamicina (0,5 ou 2,5 nM, -30min.) e estimuladas ou não com PHA (1%) por 22h. \* $p < 0,05$  e \*\*\* $p < 0,001$  em relação ao grupo meio de cultura; ## $p < 0,01$  em relação ao grupo PHA.

Observou-se que o AS605240 (0,1 ou 1  $\mu$ M - Fig.12), e o CHIR99021 (1 ou 3  $\mu$ M - Fig.14) a rapamicina (0,5 ou 2,5 nM - Fig.15), não alteraram significativamente os níveis de IL-1 em CMSP de pacientes e controles em relação à CMSP expostas apenas ao meio. Por outro lado, a inibição de PI3K com AS605240 (Fig. 14), de GSK3 com CHIR99021 (Fig. 15) e de mTOR com rapamicina (Fig. 16) em ambas

as doses aumentou os níveis de IL-1 no sobrenadante de células encubadas com PHA, em CMSP de pacientes com esquizofrenia e controles.

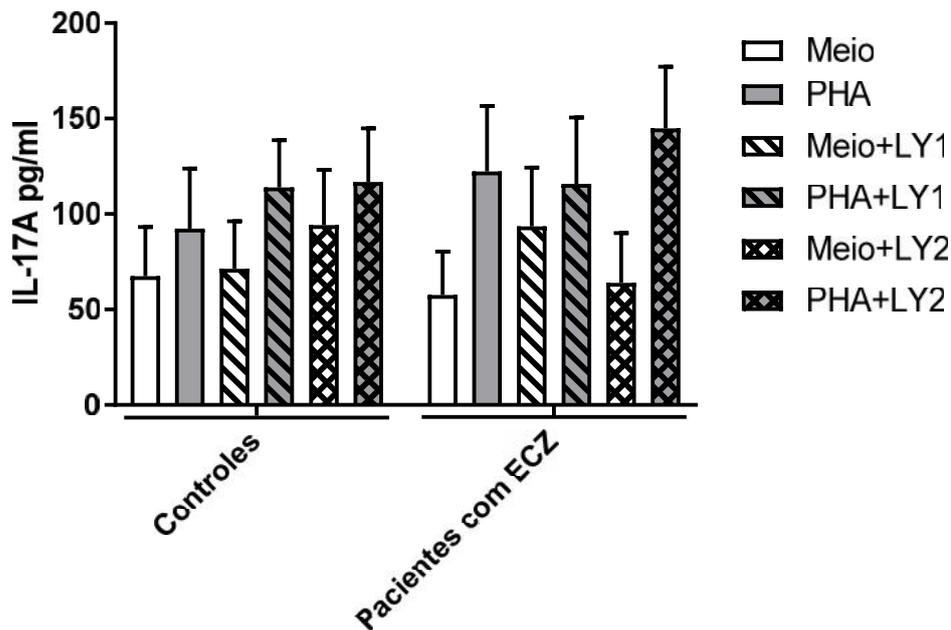
Desta forma, em geral, observou-se que inibidor não seletivo de PI3K (LY294002 1 ou 10  $\mu$ M), o inibidor seletivo PI3K (AS605240, 0,1 ou 1  $\mu$ M), o inibidor de GSK3 (CHIR99021 1 ou 3  $\mu$ M) e o inibidor de mTOR (rapamicina 0,5 ou 2,5 nM) falham na redução dos níveis da citocina pró-inflamatória IL- produzida por CMSP de controles e de pacientes com esquizofrenia, tratadas ou não com o estímulo inflamatório PHA.

## **6.6 Quantificacao de IL-17A**

### 6.6.1 Avaliação do efeito dos inibidores de PI3K sobre a produção de IL-17A por CMSP de pacientes com esquizofrenia e controles

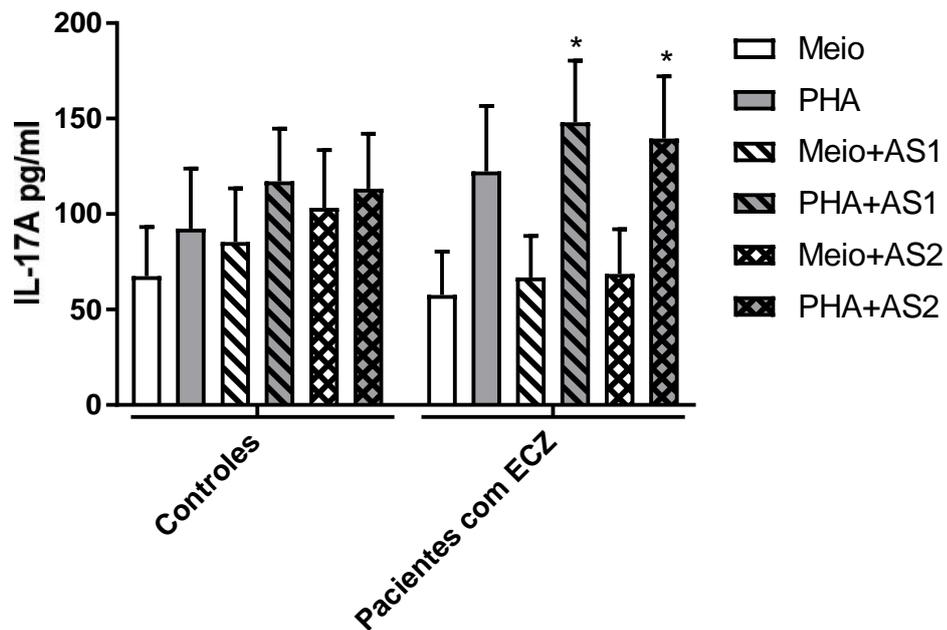
Observa-se que os níveis basais de IL-17A no sobrenadante das culturas de células não estimuladas de pacientes com esquizofrenia e controles não diferem. Da mesma forma, a estimulação com PHA não aumenta significativamente os níveis de IL-17A no sobrenadante das culturas de células de pacientes com esquizofrenia e controles de forma significativa (Fig. 17,18,19,20).

A exposição de células não estimuladas ao inibidor de todas as isoformas de PI3K com LY294002 (1 ou 10  $\mu$ M) não alterou significativamente a produção de IL-17A por CMSP de pacientes com esquizofrenia e controles estimuladas ou não com PHA ( $p > 0,05$ ; Fig. 17)



**Figura 17:** Avaliação do efeito de um inibidor de todas as isoformas de PI3K (LY294002) sobre a produção de IL-10 em cultura de CMSP. Células de pacientes com esquizofrenia ou controles na concentração aproximada de  $1 \times 10^7$  células/mL foram incubadas com LY294002 (1 ou 10  $\mu$ M, -30min.) e estimuladas ou não com PHA (1%) por 22h.

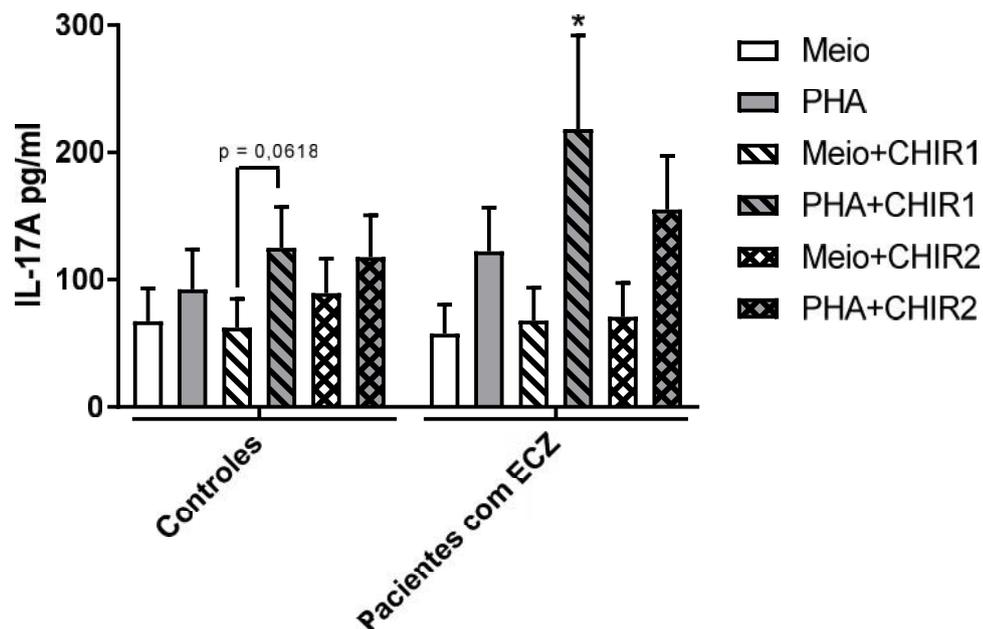
A exposição de células ao inibidor seletivo de PI3K não alterou a produção de IL-17A por CMSP de pacientes com esquizofrenia e controles não estimuladas com PHA. No entanto, LY294002 nas doses 1 ou 10  $\mu$ M aumentaram significativamente a produção de IL-17A apenas em CMSP obtidas dos pacientes estimuladas com PHA em relação às CMSP expostas apenas ao meio ( $p < 0,05$ ; Fig. 18).



**Figura 18:** Avaliação do efeito de um inibidor seletivo de PI3K (AS605240) sobre a produção de IL-10 em cultura de CMSP. Células de pacientes com esquizofrenia ou controles na concentração aproximada de  $1 \times 10^7$  células/mL foram incubadas com LY294002 (1 ou 10  $\mu$ M, -30min.) e estimuladas ou não com PHA (1%) por 22h. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo meio de cultura.

#### 6.6.2 Avaliação do efeito do inibidor de GSK3 sobre a produção de IL-17A por CMSP de pacientes com esquizofrenia e controles

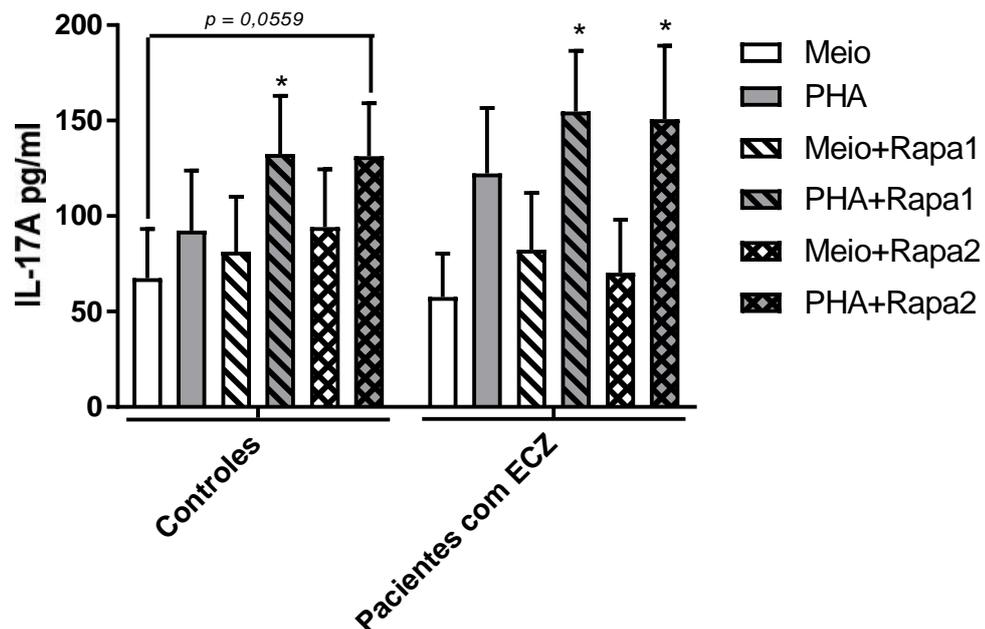
Já a exposição de CMSP a CHIR99021 (1 ou 3  $\mu$ M) não alterou a produção de IL-17A por CMSP de pacientes com esquizofrenia e controles não estimuladas com PHA. Porém, em CMSP estimuladas com PHA, observou-se um aumento significativo na produção de IL-17A apenas na dose 3  $\mu$ M (CHIR2) e em CMSP obtidas dos pacientes em relação às células expostas apenas ao meio ( $p < 0,05$ ; Fig. 20).



**Figura 19:** Avaliação do efeito de um inibidor de GSK3 (CHIR99021) sobre a produção de IL-17A em cultura de CMSP. Células de pacientes com esquizofrenia ou controles na concentração aproximada de  $1 \times 10^7$  células/mL foram incubadas com CHIR99021 (1 ou 3  $\mu$ M, -30min.) e estimuladas ou não com PHA (1%) por 22h. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo meio de cultura.

### 6.6.3 Avaliação do efeito do inibidor de mTOR sobre a produção de IL-17A por CMSP de pacientes com esquizofrenia e controles

De modo semelhante ao inibidor seletivo de PI3K, a rapamicina nas doses 0,1 ou 1  $\mu$ M aumentou significativamente a produção de IL-17A em CMSP obtidas dos pacientes estimuladas com PHA em comparação às CMSP expostas apenas ao meio. E na dose 1  $\mu$ M (Meio + Rapa2) observou-se aumento significativo da produção de IL-17 em CMSP obtidas de controles e estimuladas com PHA em comparação às CMSP expostas apenas ao meio ( $p < 0,05$ ; Fig. 20).



**Figura 20:** Avaliação do efeito de um inibidor de mTOR (rapamicina) sobre a produção de IL-10 em cultura de CMSP. Células de pacientes com esquizofrenia ou controles na concentração aproximada de  $1 \times 10^7$  células/mL foram incubadas com rapamicina (0,5 ou 2,5 nM, -30min.) e estimuladas ou não com PHA (1%) por 22h. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo meio de cultura.

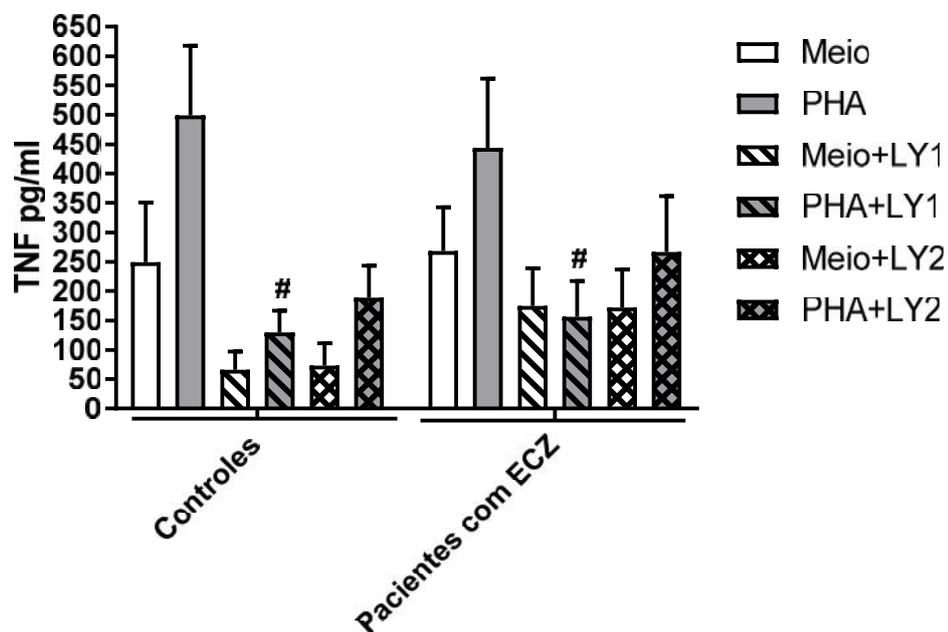
Em geral, observou-se que inibidor não seletivo de PI3K (LY294002 1 ou 10  $\mu$ M), que o inibidor seletivo PI3K (AS605240, 0,1 ou 1  $\mu$ M), o inibidor de GSK3 (CHIR99021 1 ou 3  $\mu$ M) e o inibidor de mTOR (rapamicina, 0,5 ou 2,5 nM) falham na redução dos níveis da citocina pró-inflamatória IL-17A produzida por CMSP de controles e de pacientes com esquizofrenia, tratadas ou não com o estímulo inflamatório PHA.

## 6.7 Quantificacao de TNF-

### 6.7.1 Avaliação do efeito dos inibidores de PI3K, mTOR e GSK3 sobre a produção de TNF- por CMSP de pacientes com esquizofrenia e controles

Observa-se que os níveis basais de TNF- no sobrenadante das culturas de células estimuladas ou não com PHA de pacientes com esquizofrenia e controles não diferem (Fig. 21,22,23,24).

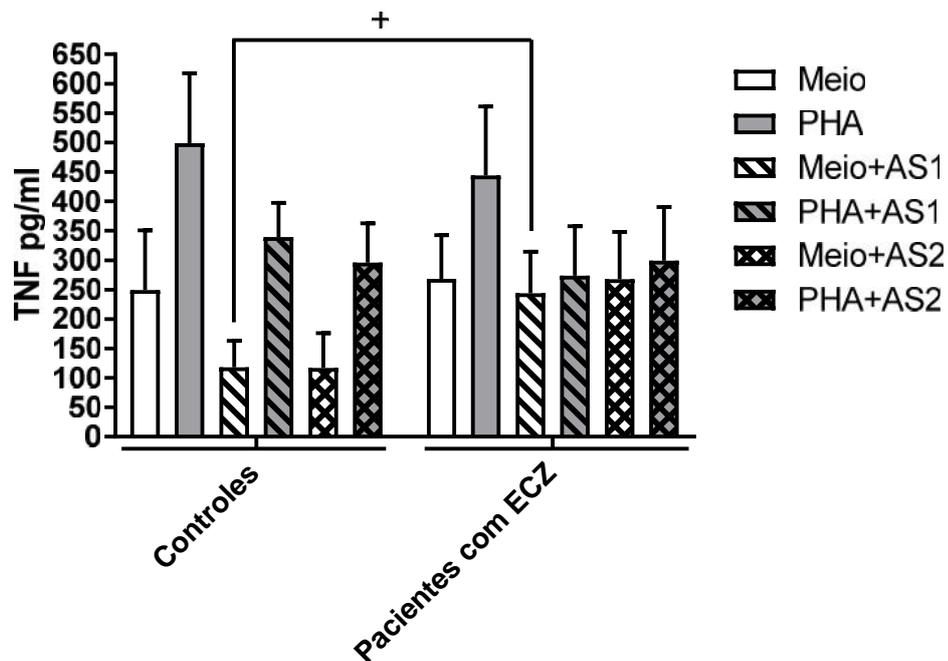
A exposição de células não estimuladas com PHA a LY294002 (1 ou 10  $\mu\text{M}$ ) não alterou a produção de TNF- $\alpha$  por CMSP de pacientes com esquizofrenia e controles em comparação a CMSP expostas apenas ao meio. Porém, em CMSP de pacientes com esquizofrenia e controles incubadas com LY294002 na maior concentração e estimuladas com PHA (PHA + LY1), observou-se diminuição significativa da produção de TNF- $\alpha$  em relação às células expostas apenas ao PHA ( $p < 0,05$ ; Fig. 21).



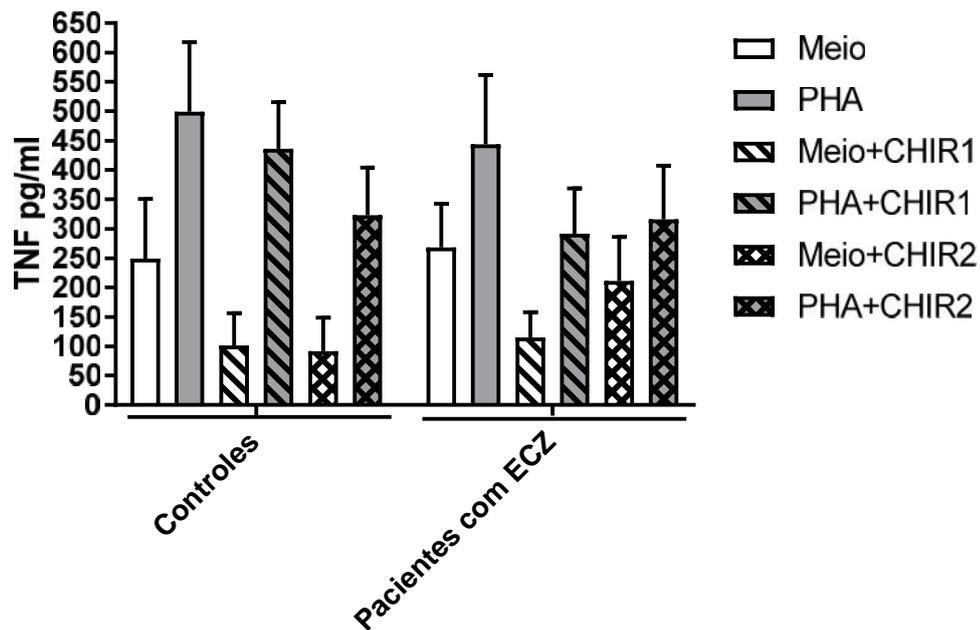
**Figura 21:** Avaliação do efeito de um inibidor de todas as isoformas de PI3K (LY294002) sobre a produção de TNF- $\alpha$  em cultura de CMSP. Células de pacientes com esquizofrenia ou controles na concentração aproximada de  $1 \times 10^7$  células/mL foram incubadas com LY294002 (1 ou 10  $\mu\text{M}$ , -30min.) e estimuladas ou não com PHA (1%) por 22h. # $p < 0,05$  em relação ao grupo PHA.

Já em células incubadas com AS605240 nas doses 0,1 ou 1  $\mu\text{M}$  (Fig. 22), ou a rapamicina nas doses 0,5 ou 2,5 nM (Fig. 23) ou a CHIR99021 nas doses 1 ou 3  $\mu\text{M}$  estimuladas ou não com PHA (Fig. 24) não observou-se alteração significativa da produção de TNF- $\alpha$  por CMSP de pacientes com esquizofrenia e controles ( $p > 0,05$ ; Fig. 22,23,24)

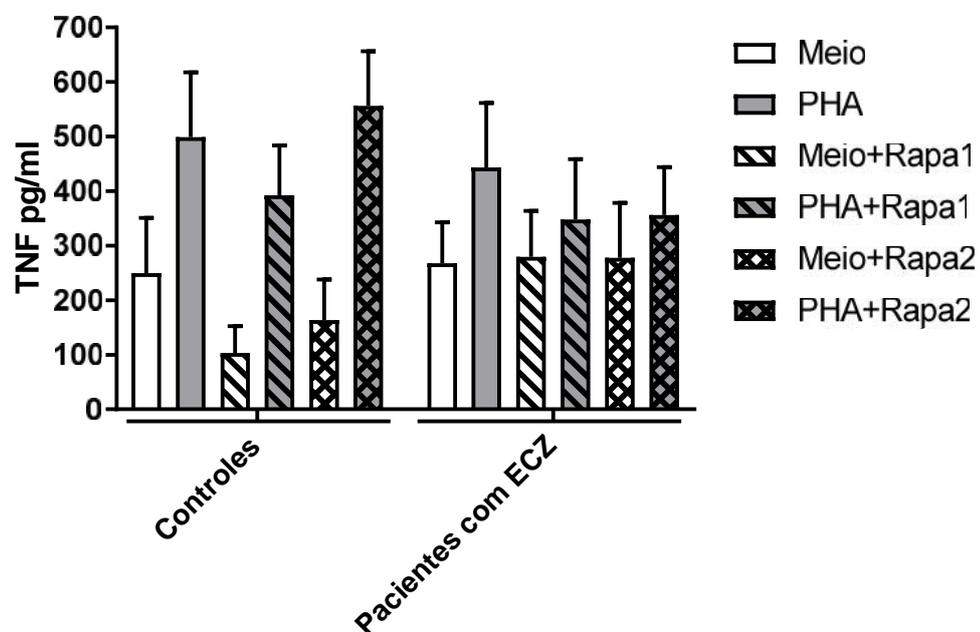
Também podemos observar que mediante à exposição do inibidor PI3K com o AS605240 em C1, há maior produção significativa de TNF- (p=0.032) por CMSP de pacientes em relação às CMSP de controles frente a mesma exposição. Demonstrando que o AS falha na redução de TNF- produzido por CMSP de pacientes.



**Figura 22:** Avaliação do efeito de um inibidor seletivo de PI3K (AS605240) sobre a produção de TNF- em cultura de CMSP. Células de pacientes com esquizofrenia ou controles na concentração aproximada de  $1 \times 10^7$  células/mL foram incubadas com AS605240 (0,1 ou 1  $\mu$ M, -30min.) e estimuladas ou não com PHA (1%) por 22h. <sup>+</sup>p <0,05.



**Figura 23:** Avaliação do efeito de um inibidor de GSK3 (CHIR99021) sobre a produção de TNF- em cultura de CMSP. Células de pacientes com esquizofrenia ou controles na concentração aproximada de  $1 \times 10^7$  células/mL foram incubadas com CHIR99021 (1 ou 3  $\mu$ M, -30min.) e estimuladas ou não com PHA (1%) por 22h.



**Figura 24:** Avaliação do efeito de um inibidor de mTOR (rapamicina) sobre a produção de TNF- em cultura de CMSP. Células de pacientes com esquizofrenia ou controles na concentração aproximada de  $1 \times 10^7$  células/mL foram incubadas com rapamicina (0,5 ou 2,5 nM, -30min.) e estimuladas ou não com PHA (1%) por 22h.

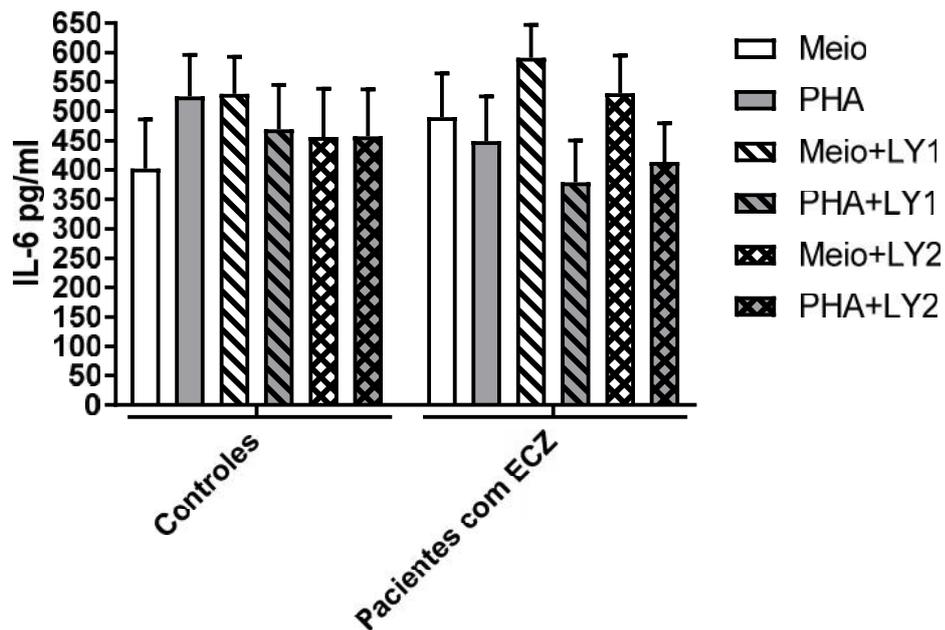
Assim, em geral, observou-se em relação ao TNF- $\alpha$  que inibidor não seletivo de PI3K (LY294002 1 ou 10  $\mu$ M), o inibidor seletivo PI3K (AS605240, 0,1 ou 1  $\mu$ M), o inibidor de GSK3 (CHIR99021, 1 ou 3  $\mu$ M) e o inibidor de mTOR (rapamicina 0,5 ou 2,5 nM) falham na redução dos níveis da citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$  produzida por CMSP de controles e de pacientes com esquizofrenia, tratadas ou não com o estímulo inflamatório PHA.

## **6.8 Quantificacao de IL-6**

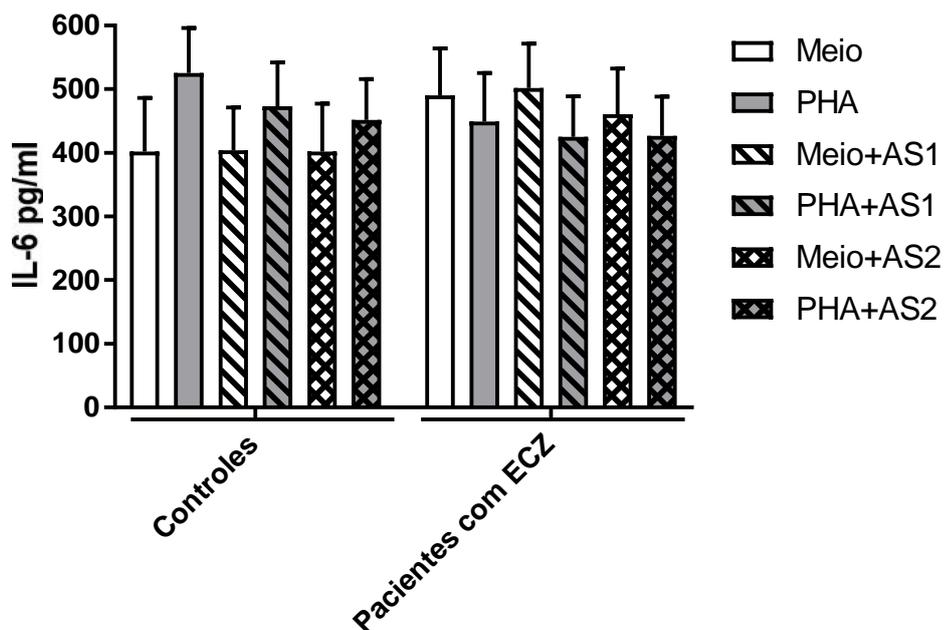
### 6.8.1 Avaliação do efeito dos inibidores de PI3K, mTOR e GSK3 sobre a producao de IL-6 por CMSP de pacientes com esquizofrenia e controles

Observa-se que os níveis basais de IL-6 no sobrenadante das culturas de células estimuladas ou não com PHA de pacientes com esquizofrenia e controles não diferentem (Fig. 25,26,27,28).

A exposição a células não estimuladas a LY294002 nas doses 1 ou 10  $\mu$ M (Fig. 13) ou a AS605240 nas doses 0,1 ou 1  $\mu$ M (Fig. 14) ou a rapamicina nas doses 0,5 ou 2,5 nM (Fig. 15) ou a CHIR99021 nas doses 1 ou 3  $\mu$ M (Fig. 16) não alterou a produção de IL-6 por CMSP de pacientes e controles. Da mesma forma, a exposição a células estimuladas com PHA às drogas citadas acima, em ambas as doses, também não alterou de forma significativa a produção de IL-6 por CMSP de pacientes e controles.

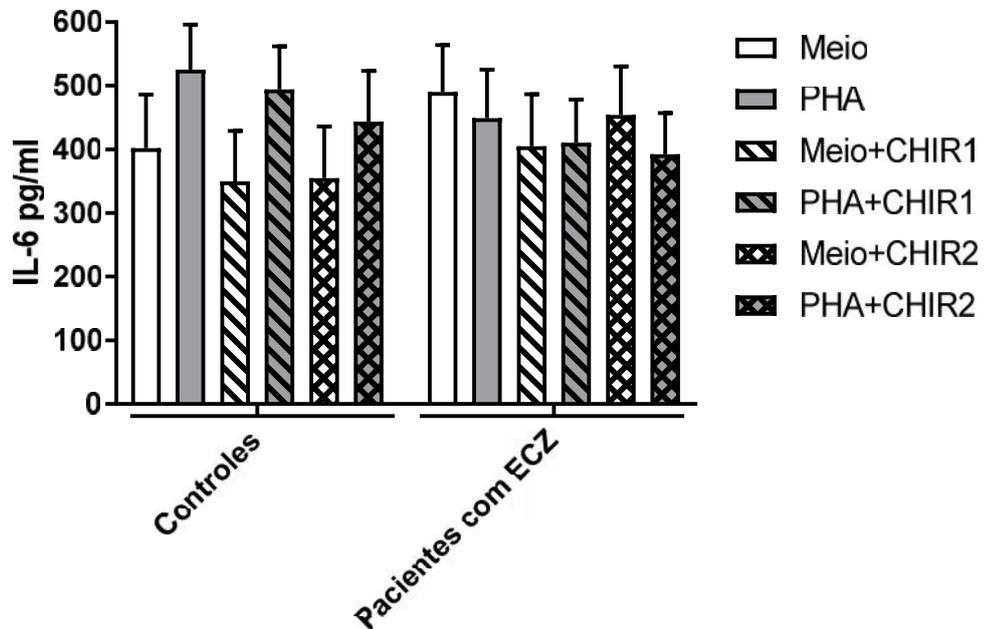


**Figura 25:** Avaliação do efeito de um inibidor de todas as isoformas de PI3K (LY294002) sobre a produção de IL-6 em cultura de CMSP. Células de pacientes com esquizofrenia ou controles na concentração aproximada de  $1 \times 10^7$  células/mL foram incubadas com LY294002 (1 ou 10  $\mu$ M, -30min.) e estimuladas ou não com PHA (1%) por 22h.

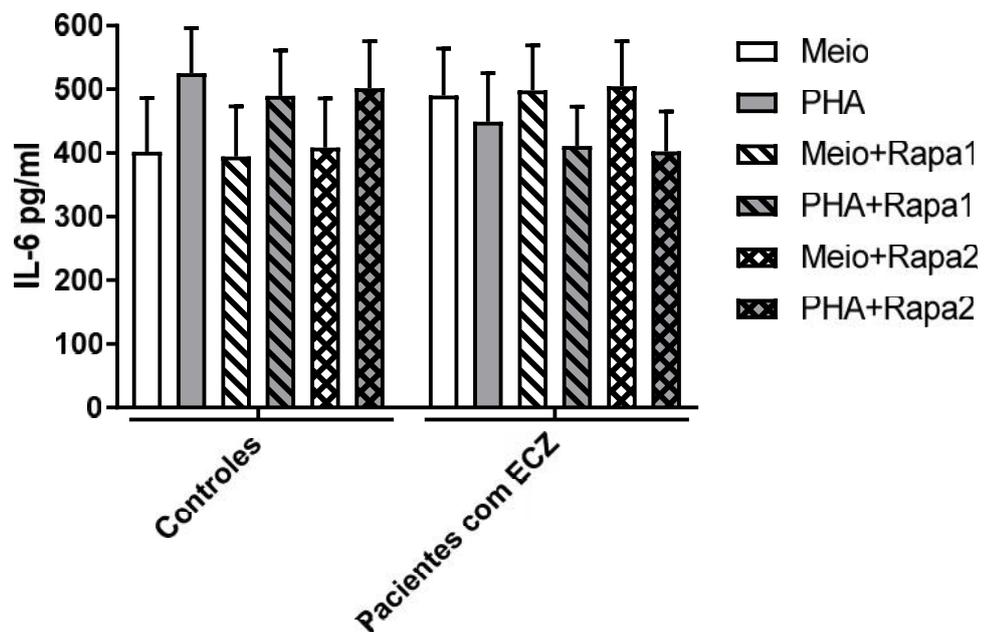


**Figura 26:** Avaliação do efeito de um inibidor seletivo de PI3K (AS605240) sobre a produção de IL-6 em cultura de CMSP. Células de pacientes com esquizofrenia ou

controles na concentração aproximada de  $1 \times 10^7$  células/mL foram incubadas com AS605240 (0,1 ou 1  $\mu$ M, -30min.) e estimuladas ou não com PHA (1%) por 22h.



**Figura 27:** Avaliação do efeito de um inibidor de GSK3 (CHIR99021) sobre a produção de IL-6 em cultura de CMSP. Células de pacientes com esquizofrenia ou controles na concentração aproximada de  $1 \times 10^7$  células/mL foram incubadas com CHIR99021 (1 ou 3  $\mu$ M, -30min.) e estimuladas ou não com PHA (1%) por 22h.



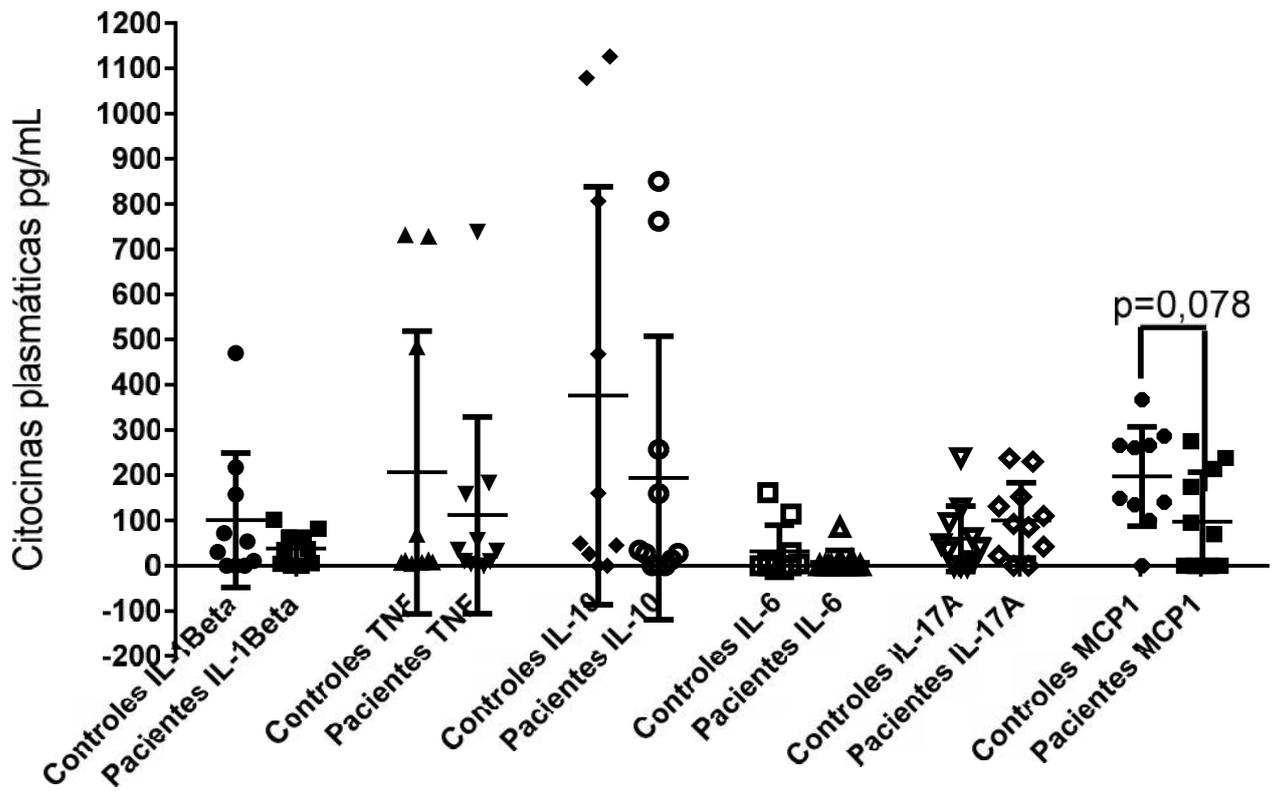
**Figura 28:** Avaliação do efeito de um inibidor de mTOR (rapamicina) sobre a produção de IL-6 em cultura de CMSP. Células de pacientes com esquizofrenia ou controles na concentração aproximada de  $1 \times 10^7$  células/mL foram incubadas com rapamicina (0,5 ou 2,5 nM, -30min.) e estimuladas ou não com PHA (1%) por 22h.

Desta forma, em geral, observou-se em relação à IL-6 que o inibidor não seletivo de PI3K (LY294002, 1 ou 10  $\mu$ M), o inibidor seletivo PI3K (AS605240, 0,1 ou 1  $\mu$ M), o inibidor de GSK3 (CHIR99021, 1 ou 3  $\mu$ M) e o inibidor de mTOR (rapamicina 0,5 ou 2,5 nM) falham na redução dos níveis da citocina pró-inflamatória IL-6 produzidas por CMSP de controles e de pacientes com esquizofrenia, tratadas ou não com o estímulo inflamatório PHA.

### **6.9 Resposta média de mediadores inflamatórios encontrados no plasma de pacientes com esquizofrenia e controles**

Conforme descrito na metodologia, 6 mL do sangue periférico de pacientes e controles foi coletado separadamente em tubos a vácuo sem heparina e centrifugados para a obtenção de plasma. Assim, foi possível realizar a avaliação de mediadores inflamatórios neste fluido. Esta avaliação possui particular importância uma vez que através dela foi possível quantificar mediadores inflamatórios produzidos por demais células/vias celulares a nível sistêmico.

Descrevemos anteriormente uma diminuição significativa dos níveis basais da citocina anti-inflamatória IL-10 produzidas pelas CMSP de pacientes em relação a controles ( $p=0,014$ ). No entanto, esta diminuição não foi observada em nível plasmático. Este interessante dado sugere uma possível alteração nas CMSP de pacientes com esquizofrenia. Por outro lado, observou-se uma importante tendência ( $p = 0,078$ ) de redução de MCP-1 no plasma de pacientes em relação a controles. No entanto, não foi observada nenhuma tendência de alteração desta citocina produzida por CMSP de pacientes em relação a controles, o que sugere que tal tendência de alteração ocorre por outras células diferentes das CMSP.



**Figura 29:** Quantificação das citocinas IL-1, TNF-, IL-10, IL-6, IL-17A e MCP-1 no plasma de indivíduos controles e pacientes com esquizofrenia

## 7. DISCUSSÃO

Neste trabalho 25 gráficos foram produzidos a partir da observação da resposta de células de pacientes com esquizofrenia e controles, em mesma concentração aproximada de  $1 \times 10^7$  CMSP/mL. Tais células foram incubadas com drogas que atuam em diferentes pontos da via celular PI3K/AKT/GSK3/mTOR e estimuladas com ou não com PHA 1%. Observamos que, de uma forma geral, de acordo com cada condição experimental, CMSP são capazes de produzir níveis diferenciais de IL-10, MCP-1, IL-1, IL-17A, TNF- $\alpha$  e IL-6, demonstrando a eficácia das drogas utilizadas. No entanto, observamos que a maioria das alterações ocorreram em ambos os grupos de pacientes e controles, e de forma muito similar, conforme os gráficos aqui apresentados. Uma possível explicação para as similaridades de respostas de células de pacientes e controles frente ao mesmo estímulo é a estabilização da via celular por fármacos neuropsiquiátricos utilizados por pacientes para a estabilização clínica da esquizofrenia (ver tabelas 2 e 3).

Em concordância com esta hipótese, crescente número de trabalhos apontam que um dos possíveis mecanismos de ação de antipsicóticos, antidepressivos, e de benzodiazepínicos é a modulação do sistema imune, via PI3K, AKT, GSK3 e mTOR. Este promissor, interconectado e complexo mecanismo intracelular vem sendo apontado por alguns autores enquanto importante na sinalização dopaminérgica, mediando a sinalização da dopamina no receptor dopaminérgico do tipo D2 (D2R). Deste modo, acredita-se que tal sinalização tenha importante papel não apenas na fisiopatologia da esquizofrenia (em que a hipótese dopaminérgica já está consolidada na literatura científica), como também estão envolvidos no mecanismo de ação de antipsicóticos, especialmente os antagonistas e agonistas parciais da dopamina (Freyberg & Javitch, 2010).

Diversas evidências apontam que em pacientes com esquizofrenia há uma hiperativação de D2R, o que leva ao recrutamento da proteína  $\beta$ -arrestin 2 e da PIP2A, formando o complexo  $\beta$ -arrestin--PIP2A-AKT e levando à desfosforilação e consequente hipoatividade do AKT. Mediante à hipoatividade do AKT no paciente com esquizofrenia, há maior (e não fisiológico) aumento da atividade do GSK3 (ativo em sua forma não fosforilada). Neste contexto, alguns autores apontam que um dos

possíveis mecanismos intracelulares de antipsicóticos modulando esta via celular é inibindo ou diminuindo a ativação do receptor dopaminérgico D2R. Desta forma, não há o recrutamento da  $\beta$ -arrestin 2, nem a formação do complexo  $\beta$ -arrestin 2-PP2A-AKT, prevalecendo assim o aumento da atividade de AKT, que fosforila o GSK3, diminuindo a sua atividade. (Freyberg & Javitch, 2010). Tais dados associados à resultados de hipoatividade/redução da expressão de PI3K e AKT encontrados em CMSP e em cérebros de pacientes com esquizofrenia virgens de tratamento (van Beveren et al., 2012; Emanian 2012) reafirmam a possível modulação da via celular PI3K/AKT/GSK3/mTOR por neuropsicofármacos (especialmente os antipsicóticos) enquanto um dos mecanismos da regulação da via celular e estabilização clínica da esquizofrenia (Freyberg & Javitch, 2010; Kumarasinghe et al., 2013).

Neste contexto, diversas evidências apontam que a sinalização através da via PI3K/AKT/GSK3/mTOR parece ser o ponto de interseção em comum dos fármacos lítio, clozapina, haloperidol e diversos outros antipsicóticos, seja eles típicos ou atípicos (Kumarasinghe et al., 2013). Em concordância com tais dados, Xu e colaboradores (2007) analisou 384 pacientes com esquizofrenia e 384 controles saudáveis e demonstraram que polimorfismo no gene AKT1 observado em uma população chinesa está implicado ao maior risco de desenvolver esquizofrenia, bem como à resposta terapêutica a antipsicóticos, e ao efeito extrapiramidal induzido pela clorpromazina (Xu et al., 2007). Desta forma, é possível que os antipsicóticos típicos e atípicos tenham em comum modulação da via (ou mesmo parte da via) intracelular PI3K/AKT/GSK3/mTOR que possa estar parcialmente disfuncional.

É importante destacar que, de um modo geral, observamos similaridades nas respostas médias de indivíduos frente a estímulos diferentes, bem como na comparação entre a expressão de citocinas por CMSP de pacientes e controles quando expostos aos mesmos tratamentos ou meios. É possível que fármacos utilizados para estabilização clínica sejam capazes de estabilizar a via PI3K/AKT/GSK3/mTOR, com conseqüente regulação dos níveis de citocinas inflamatórias produzidas pela via celular. Interessantemente, por algum motivo a citocina anti-inflamatória IL-10 permanece hiporegulada em pacientes estáveis clinicamente, uma vez que foi observada neste trabalho significativamente em baixos

níveis em sobrenadantes de CMSP expostas apenas ao meio, no grupo de pacientes com esquizofrenia estáveis clinicamente em comparação à controles.

Conforme dito anteriormente, é possível que os resultados similares entre os grupos de pacientes com esquizofrenia e controle estejam relacionados à possível estabilização da via celular por medicamentos neuropsiquiátricos. No entanto, apesar das similaridades de resposta de células de pacientes com esquizofrenia encontrados neste trabalho, diferenças significativas ou mesmo tendências a diferenças foram observadas especificamente em relação à citocina anti-inflamatória IL-10. Vimos que quando CMSP foram expostas apenas ao meio de cultura, níveis basais de IL-10 foram observados significativamente reduzidos em relação a controles ( $p= 0,014$ , Fig. 5,6,7,8).

Este interessante resultado vai de encontro aos dados de uma importante e bem delineada Revisão Sistemática com meta-análise realizada por Gao e colaboradores em 2014. Tal trabalho demonstrou associação entre o polimorfismo de determinado SNP de IL-10 com a hipoexpressão de IL-10 na esquizofrenia. Considerada enquanto uma RS de alto nível de evidência (pontuação 8/11 no check-list AMSTAR, este trabalho realizou meta-análise em 9 estudos publicados entre 2002-2011, e demonstrou que indivíduos com genótipos para baixa produção de IL-10 possuem maior risco de desenvolver esquizofrenia (Gao et al., 2014).

Também em concordância com os nossos resultados, a hipoexpressão de IL-10 em pacientes com esquizofrenia vem sendo suportado por outros bons trabalhos primários mais recentes. De particular importância, a hipoexpressão de IL-10 vem sendo demonstrada em pacientes com esquizofrenia em diferentes status clínicos. Em uma coorte com 256 pacientes em primeiro surto psicótico e virgens de tratamento e 540 controles saudáveis, Xiu e colaboradores (2016) demonstraram baixos níveis de IL-10 no soro de pacientes em comparação a controles, disfunção esta co-relacionada à variações gênicas e disfunções cognitivas observadas nos pacientes com esquizofrenia em comparação à controles (Xiu et al., 2016). Já Zhang et al., (2017), em um estudo transversal, também observou baixos níveis de IL-10 no plasma de 41 pacientes crônicos com esquizofrenia em comparação à 40 controles saudáveis. Adicionalmente, em análise pós-mortis de cérebros de pacientes crônicos

com esquizofrenia, Pandey et al., 2018 observaram menor expressão gênica e proteica significativa da citocina anti-inflamatória IL-10 no cérebro de pacientes crônicos com esquizofrenia em comparação aos níveis do mesmo mediador inflamatório encontrados no cérebro de controles saudáveis.

Interessantemente, ao analisarmos no gráfico do pubmed (Results by year), quase 55% de publicações relacionando IL-10 e esquizofrenia foram publicados nos últimos 5 anos. Tais dados acima descritos, em conjunto com os nossos resultados, reforçam a importância e interesse crescente do tema na literatura científica, e apontam a IL-10 enquanto possível futuro biomarcador tanto em pacientes virgens de tratamento quanto em pacientes crônicos e estabilizados clinicamente. No entanto, futuros trabalhos comparando estes achados na esquizofrenia com demais desordens psiquiátricas são necessários para situar a IL-10 enquanto importante biomarcador da esquizofrenia e no diagnóstico diferencial da esquizofrenia com demais desordens psiquiátricas.

Adicionalmente, apesar de termos observado diminuição significativa dos níveis basais da citocina anti-inflamatória IL-10 produzidas pelo mesmo número aproximado de CMSP ( $1 \times 10^7$  células/mL) de pacientes em relação a controles ( $p=0,014$ , Fig. 5,6,7,8), esta diminuição não foi observada de forma significativa a nível plasmático (Fig. 26). Este interessante dado sugere uma possível alteração no interior das CMSP de pacientes com esquizofrenia enquanto responsável por esta diminuição dos níveis de IL-10. No entanto, novos estudos são necessários a fim de confirmar tal hipótese.

Assim, é importante refletirmos que apesar da possibilidade dos medicamentos neuropsiquiátricos utilizados pelos pacientes estabilizarem a via celular PI3K/AKT/GSK3/mTOR e a grande maioria dos mediadores inflamatórios aqui analisados, tais fármacos falharam na estabilização dos níveis basais da citocina anti-inflamatória IL-10 produzidas por CMSP de pacientes. Já em relação à tentativa de modulação da IL-10 produzidas por CMSP com diferentes drogas que atuam na via PI3K/AKT/GSK3/mTOR, observamos tendências à diminuição ou mesmo diminuição significativa de IL-10 mediante a exposição celular à LY294002, AS605240, CHIR99021 ou rapamicina. Desta forma, a modulação desta citocina

com tais fármacos não nos parece vantajosa para pacientes com esquizofrenia, uma vez que tais drogas diminuem ainda mais os níveis desta citocina anti-inflamatória. Assim, não houve modulação positiva, ou seja, não observamos elevação dos níveis desta citocina anti-inflamatória por CMSP.

Outro resultado de particular interesse foi a modulação negativa da citocina pró-inflamatória MCP-1. MCP-1 foi a única citocina pró-inflamatória em que observamos redução significativa na maioria das condições experimentais em que CMSP foram testadas. Observamos que mediante ao meio de cultura, CMSP de pacientes e controles produziram níveis de MCP-1 sem diferença significativa. É provável que este resultado tenha influência da possível estabilização da via por medicamentos neuropsiquiátricos, conforme vimos anteriormente. Apesar disto, a inibição de todas as isoformas de PI3K com LY294002 (1 ou 10  $\mu\text{M}$ ) e a inibição de mTOR com rapamicina (0,5 ou 2,5 nM) em células estimuladas ou não com PHA, foram eficazes na redução significativa de MCP-1 produzida por células de pacientes com esquizofrenia e controles. Já o inibidor seletivo PI3K (AS605240 0,1 ou 1  $\mu\text{M}$ ) levou à diminuição dos níveis de MCP-1 no sobrenadante de células apenas de pacientes com esquizofrenia e incubadas com PHA1%, em comparação às CMSP expostas ao meio de cultura. Tal resultado nos aponta uma possibilidade de manejo da diminuição dos níveis da citocina pró-inflamatória MCP-1 em pacientes com esquizofrenia resistentes ou pouco responsivos ao tratamento convencional mediante a tais drogas, em ambas as concentrações. Até que ponto haveria este interesse ainda cabe discussão a partir de futuros trabalhos, uma vez que neste estudo os níveis de MCP-1 basais, ou seja, os níveis presentes no sobrenadante das culturas de células de pacientes e controles, mediante apenas ao meio não diferem estatisticamente.

A nível plasmático, apesar de observada uma importante tendência ( $p = 0,078$ ) de menores níveis de MCP-1 no plasma de pacientes estáveis clinicamente em relação a controles, não observamos diferença estatística. Em concordância com nossos dados, Pae et al., 2004, avaliaram o polimorfismo gênico -2518A/G e sua correlação com os níveis de MCP-1 entre pacientes coreanos com esquizofrenia estáveis clinicamente e controles. Os autores observaram que a distribuição de genótipo e alelos entre pacientes com esquizofrenia e controles não foram diferentes. No

entanto, observaram que a a distribuição de genótipos e alelos foram diferentes ao compararem pacientes com predomínio de sintomas positivos ou negativos, chamando a atenção para a heterogeneidade amostral dentro do grupo de pacientes com esquizofrenia e da necessidade de novos estudos sobre o assunto (Pae et al., 2004). A correlação estatística do PANSS dos pacientes com os resultados nos parece uma abordagem interessante e cabível de aplicação em próximos estudos em que o n amostral permita tal associação.

A partir dos resultados deste trabalho, apontamos que estudos futuros de novos alvos moleculares visando especificamente a modulação positiva da citocina anti-inflamatória IL-10 na esquizofrenia são necessários e de extrema importância. Adicionalmente, em meio à nossa constante necessidade de busca por respostas sobre o que é ou reje a esquizofrenia a nível molecular, e mediante a interessantes resultados que observamos sobre a IL-10 basal produzida por CMSP de pacientes com esquizofrenia, talvez conseguiremos maior excelência em dados futuros ao focarmos em IL-10, buscando maior controle cinético desta citocina pró-inflamatória a medindo em momentos ideais de seu pico de produção.

De um modo geral, também é importante ter a visão crítica de que, no mundo real, as células aqui estudadas fazem parte de todo um contexto fisiológico no organismo, interagindo com outras células e sistemas a todo tempo. Seguindo esta linha de pensamento, culturas celulares são expostas a diferentes concentrações de fármacos em comparação às concentrações que usualmente estariam expostas estas células inseridas em um organismo (conjunto de sistemas interagindo). Tal fato pode resultar em respostas de vias de sinalização intracelulares diferentes das respostas que ocorreriam com estas mesmas células, mas no meio biológico. Isto pode levar a resultados discrepantes do “mundo real” das células inseridas em um contexto biológico e interativo com outras células, vias celulares e moléculas a todo tempo. Apesar disto, a avaliação de culturas celulares é capaz nos proporcionar resultados mais focados/precisos sobre o que uma determinada e específica célula é capaz de produzir mediante a um determinado e específico estímulo.

Adicionalmente, é preciso pensar criticamente que a modulação da via, ou mesmo de pontos específicos da via é delicado por se tratar de uma via celular com funções

fisiológicas cruciais à vida, com pequenas variações posológicas podendo levar a importantes efeitos colaterais. Assim, permanece a necessidade de futuros estudos com associação de achados *in vivo* e *in vitro*, em humanos e em modelos animais da esquizofrenia, a fim de conseguir achar interseções de conhecimento e elucidar o imenso quebra-cabeça do conhecimento do que é a neurobiologia da esquizofrenia.

Aqui realizamos um estudo transversal visando contribuir para este conhecimento. No entanto, apesar de o estudo transversal ser considerado metodologicamente simples, objetivo, com rápida coleta de dados e de menor custo por não necessitar de seguimento da amostra ao longo do tempo, existem algumas dificuldades e vieses inerentes a este delineamento metodológico, tais como maior vulnerabilidade aos vieses de prevalência e de seleção da amostra (Almeida Filho & Rouquayrol, 2002). Com isto em mente, buscamos minimizar, na medida de nossas possibilidades, tais dificuldades a fim de gerarmos dados individuais representativos de determinado grupo populacional (pacientes com esquizofrenia, estáveis clinicamente) para que dados individuais sejam capazes de representar o coletivo populacional mediante ao grande impasse do “eu” e do “todo”, do “individual” ao “coletivo”, na difícil tarefa epidemiológica de globalizar resultados.

Neste contexto, acerca dos pontos fortes deste trabalho, ao pensarmos em sua condução metodológica, buscamos alternativas possíveis a fim de controlar variáveis confundidoras em potencial sobre os resultados bem como resultados contexto-dependentes e vieses operacionais frequentemente encontrados na literatura prévia sobre o assunto. Para tanto, realizamos: rigorosa seleção de pacientes, controlando o viés de seleção ao excluirmos da pesquisa indivíduos não estáveis clinicamente e com características que por si só alteraria a resposta celular frente a estímulos diversos (como por ex. uso recente de anti-inflamatórios e presença de síndrome metabólica); pareamento 1:1 entre pacientes e controles por gênero, idade, e escolaridade (sendo este último um importante indicador social, econômico, cultural e alimentar); controle operacional durante a realização da análise das amostras por CBA e ELISA, codificando as amostras e realizando alocação aleatória das mesmas nas placas de leitura; análise duplo-cego de amostras, com pessoas diferentes tendo acesso aos mesmos dados; organização dos resultados por duas pessoas de forma independente; colaboração com um estatístico frente a complexidade dos

dados, a fim de obtermos uma ideal e confiável análise estatística. Adicionalmente, realizamos a descrição de todo o trabalho de forma clara e transparente, seguindo todo o check-list da ferramenta STROBE, sem, no entanto, inibir a originalidade, singularidade e criatividade de escrita.

Ainda acerca dos pontos fortes deste trabalho, neste trabalho tivemos o cuidado de coletar dados sócio-demográficos e observamos que o pareamento 1:1 entre pacientes e controles ocorreu de modo satisfatório. Fato demonstrado pela alta semelhança de idade, sexo e escolaridade entre pacientes e controles (ver tabela 1). Adicionalmente, outras informações coletadas, como estado civil e situação trabalhista forneceram dados que vão de encontro com os dados presentes na literatura científica sobre indivíduos com esquizofrenia em comparação com a população em geral sem esquizofrenia. Sendo eles: maior índice de desemprego, aposentadoria precoce ou trabalho não registrado, bem como baixo índice de parceiros estáveis ao longo da vida (van Os et al., 2010; Michalska et al., 2018), maior histórico de uma ou mais drogas de abuso (lícitas e ilícitas), maior repetência escolar bem como maior histórico de parentes de primeiro grau com desordens psiquiátricas na população com esquizofrenia (van Os et al., 2010; Blokland et al., 2017). Desta forma, a análise da amostra de pessoas com esquizofrenia utilizada neste trabalho sugere forte representatividade da população com este transtorno mental, dado este essencial para a validade externa deste trabalho.

No entanto, apesar da extrema importância do controle de vieses em potencial sobre os resultados, coletar dados de determinados grupos populacionais com extremo rigor levou à diminuição do n amostral. Tal fato possui um peso importante, especialmente no caso de uma população clinicamente heterogênea, como é o caso da esquizofrenia. Neste contexto, o fato de apenas 11 pacientes (7 homens e 4 mulheres) terem cumprido todos os critérios de elegibilidade deste trabalho também dificultou a avaliação de produção diferencial de citocinas entre homens e mulheres. Vale ressaltar que mulheres geralmente apresentam o primeiro surto mais tardiamente, bem como apresentam curso mais benigno da esquizofrenia em relação aos homens portadores deste sofrimento mental. De diferente prognóstico, não é de se espantar que mulheres com esquizofrenia geralmente necessitam de doses menores de antipsicóticos e comumente respondem melhor a diferentes

medicamentos em relação aos homens com a mesma doença. Desta forma, a compreensão molecular dessa diferença entre homens e mulheres é essencial para melhor tratamento e qualidade de vida de pessoas com esquizofrenia (Seeman, 2004; Chen et al., 2016). Adicionalmente, em projeto paralelo com avaliação longitudinal de camundongos machos e fêmeas do modelo animal de neurodesenvolvimento da esquizofrenia realizado por nosso grupo de estudos, observamos que machos e fêmeas deste modelo animal produzem citocinas plasmáticas de modo diferencial ao longo do tempo e em relação ao sexo e ao grupo controle (resultados ainda não publicados). Tais dados reforçam a necessidade de futuras avaliações epidemiológicas (especialmente as longitudinais) de citocinas na população com esquizofrenia considerando o fator tempo, status clínico, medicamentos em uso e com análise estatística separada para homens e mulheres com a doença. Tais fatores são fundamentais para o estabelecimento, entendimento, controle de estágios prodômicos, evolução da doença ao longo do tempo e para a sonhada farmacoterapia individualizada. Desta forma, em experimentos futuros pretendemos manter o rigor metodológico da seleção da amostra. No entanto, pretendemos abordar pacientes de diferentes unidades psiquiátricas, o que aumentaria consideravelmente o n amostral.

Acerca dos pontos fracos deste trabalho e portanto variáveis confundidoras em potencial sobre os resultados relatados, apontamos: **i)** o baixo n amostral; **ii)** a ausência de perguntas sobre o momento do ciclo menstrual das mulheres (pacientes e controles) no dia da coleta de sangue; **iii)** o não controle da cinética diferente das citocinas avaliadas.

Com isto em mente, em futuros estudos a serem realizados por nosso grupo de pesquisa pretendemos adicionar ao questionário feminino perguntas sobre o momento do ciclo menstrual das mulheres no dia da coleta de sangue, uma vez que o ciclo menstrual de mulheres são regidos por mediadores inflamatórios, com variação significativa de várias citocinas pró-inflamatórias durante a fase folicular, fase esta que se inicia com o período menstrual e possui durabilidade entre 12 a 14 dias. De particular importância, durante a fase menstrual há um aumento significativo de 1,5 a 3 vezes de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 , IL-6, IL-8 e HGF (fator de crescimento de hepatócitos) em relação à fase folicular tardia

(Whitcomb et al., 2014). Desta forma, a fase folicular, especialmente em seu início é um período em que avaliação de citocinas e quimiocinas devem ser evitadas.

Acerca da cinética diferente das citocinas sejam elas inflamatórias ou regulatórias, Sadahiro e colaboradores (2007) demonstraram que células mononucleares de humanos expostos a determinados estímulos produzem diferentes citocinas em momentos diferentes e de forma dependente ao tipo de estímulo realizado, chamando a atenção para a cinética diferente de produção e de degradação de citocinas, bem como a dependência do fator tempo neste processo. Neste contexto, no presente trabalho células mononucleares do sangue periférico foram incubadas com 4 diferentes drogas e em seguida estimuladas ou não com PHA 1%. Após 22h, sobrenadantes contendo as citocinas produzidas foram coletadas. Mediante a tais dados, é possível que o fato de não termos encontrado determinadas alterações significativas de citocinas em pacientes com esquizofrenia em relação a controles, seja devido às cinéticas diferentes das citocinas. Ou seja, talvez fosse necessário um tempo superior a 22 horas de estímulo para produção total de uma citocina específica. Ou mesmo, é possível que em 22 horas algumas citocinas já tenham se degradado ou mesmo sofrido algumas distorções conformacionais que não permitiram a sua detecção. No entanto, até onde sabemos, ainda não existem trabalhos demonstrando de forma longitudinal o tempo de produção e de degradação de citocinas mediante às drogas neste trabalho utilizadas. Desta forma, futuras investigações sobre o assunto são necessárias e de grande importância.

Atualmente permanece a necessidade de busca pelo conhecimento sobre a modulação de qual via(s) celular(es) leva(m) ao efeito terapêutico, bem como qual modulação leva a importantes efeitos colaterais motores, motivacionais e metabólicos tão deletérios à adesão ao tratamento medicamentoso. Adicionalmente, fármacos capazes de levar à melhoria não apenas dos sintomas positivos da doença, mas também dos sintomas negativos e cognitivos são de suma importância para a evolução da farmacoterapia da esquizofrenia. Assim, novos estudos primários, especialmente os estudos com maior potencialidade de produção de conhecimento causal (como coorte ou caso-controle) em diferentes populações do Planeta Terra e com alto rigor metodológico (em sua realização e descrição), considerando sexo, status clínico e terapia medicamentosa em uso são necessários

para a realização de estudos secundários como Revisão sistemática com meta-análise de boa qualidade (seguindo o check-list *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analysis* - PRISMA\*) que consigam respostas satisfatórias para a futura elaboração de Protocolos Clínico-Terapêuticos (PTC ou revisão Sistemática de Revisões Sistemáticas ou Overview de Revisões Sistemáticas), delineamento de estudo capaz de levar à aplicabilidade da ciência em prol da saúde populacional, ou seja, tornando possível o elo entre a academia e a clínica, elo este crucial para o estabelecimento da prática clínica baseada em evidências (Silva et al., 2012; 2014)

Acreditamos que seguindo este caminho é possível que futuramente diferenças nas respostas individuais aos antipsicóticos podem ser compreendidas através da elucidação de diferentes vias celulares responsáveis pela transcrição de mediadores inflamatórios. Apesar de toda a heterogeneidade gênica, fenotípica, cultural e clínica em que a esquizofrenia se manifesta, com toda a sua intensidade existencial, parece haver um importante fator em comum: a alteração dos níveis de mediadores inflamatórios. Tal observação nos leva a pensar na hipótese de alterações em diferentes vias celulares responsáveis pela transcrição de citocinas em diferentes pacientes inseridos em diferentes culturas e hábitos alimentares. O avanço farmacológico associado à confirmação molecular de qual(is) via(s) celular(es) estaria(m) afetada(s) em um indivíduo específico abriria portas para a tão sonhada farmacoterapia individualizada e para a farmacogenômica.

## 8 CONCLUSÃO

Enquanto um estudo transversal, fizemos uma avaliação seccional/pontual em busca de uma melhor compreensão do papel da via intracelular PI3K/AKT/GSK3/mTOR no mecanismo patofisiológico da esquizofrenia. Para tanto, criteriosa seleção de pacientes e controles baseados em extensa e crítica leitura da literatura prévia sobre o assunto foi realizada neste trabalho. Acreditamos que o pareamento 1:1 entre pacientes e controles, especialmente o pareamento por escolaridade (um importante indicador social, econômico, cultural e alimentar) foram cruciais para nos levar a um novo olhar sobre as alterações moleculares da doença, bem como constitui um importante diferencial deste trabalho em relação à literatura científica da área atualmente publicada.

Nossos resultados reforçam a hipótese de que um dos possíveis mecanismos celulares dos medicamentos psiquiátricos ocorre através da modulação de via PI3K/AKT/GSK3/mTOR em células do sistema imune de pacientes com esquizofrenia, bem como reforçam dados progressos sobre a citocina anti-inflamatória IL-10. Aqui demonstramos a constante desregulação desta citocina pro-inflamatória mesmo em pacientes clinicamente estáveis e ao uso crônico de medicamentos psiquiátricos apontados como moduladores da via celular aqui estudada. Assim, este trabalho reforça hipóteses já apontadas bem como contribui (mesmo que minimamente) para uma melhor elucidação da neurobiologia da doença, apontando caminhos para o direcionamento, planejamento e desenvolvimento de novas modulações imunes em busca de novos e mais eficazes medicamentos psiquiátricos, melhor prognóstico da doença, assim como complementação da informação científica sobre o tema estudado. No entanto, percebemos claramente que o capítulo final da história da compreensão molecular/bioquímica da esquizofrenia ainda não foi escrito, sendo esta uma importante tarefa para os próximos anos.

## 9 APENDICES

### APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

#### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Nº de registro no COEP: \_\_\_\_\_ ( )Paciente ( ) Controle

Título do Projeto: **“Avaliação do padrão de resposta diferencial da via intracelular mTOR em células mononucleares do sangue periférico de pacientes com esquizofrenia”**

O (A) senhor (a) está convidado (a) a participar, como voluntário (a), de uma pesquisa de título “Avaliação do padrão de resposta diferencial da via intracelular mTOR em células mononucleares do sangue periférico de pacientes com esquizofrenia”. O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que está sendo realizada. Sua colaboração neste estudo é muito importante, mas a decisão de participar deve ser sua. Para tanto, leia atentamente as informações abaixo e não se apresse a decidir. Se você não concordar em participar ou quiser desistir a qualquer momento, isso não causará nenhum prejuízo a você. Se você concordar em participar, basta preencher os seus dados e assinar a declaração concordando com a pesquisa. Se você tiver alguma dúvida, pode esclarecê-la com o responsável da pesquisa. Obrigado (a)

#### Objetivo do Estudo

Testar a hipótese de que existe uma desregulação da via de sinalização PI3K/AKT/GSK3/mTOR de Células Mononucleares Periféricas de pacientes com esquizofrenia.

#### Procedimentos

Este estudo é feito por meio de testes neuropsicológicos, uso de questionários e escalas, exame clínico e a dosagem de algumas substâncias presentes no sangue. Os testes duram cerca de uma hora. Após os testes será feita a coleta de sangue para dosagem de substâncias.

#### Pesquisadores

A equipe de pesquisadores é composta pelo psiquiatra Dr. João Vinícius Salgado (coordenador da pesquisa), por alunos de mestrado e doutorado da UFMG, e por alunos de iniciação científica, todos devidamente autorizados pelo pesquisador principal (Dr. João Vinícius Salgado).

#### Confidencialidade

Todos os dados gerados serão mantidos em sigilo, e apenas a equipe de pesquisadores terá acesso a eles. Os dados de cada participante serão codificados, e não terão nenhuma identificação que permita associá-lo a um participante em particular. Caso o senhor (a) queira, poderá ter acesso aos resultados individuais.

#### Benefícios e riscos

Esta pesquisa não oferece qualquer risco aos participantes. Não há benefício individual direto, mas as informações obtidas com esta pesquisa nos auxiliarão a melhor compreender a esquizofrenia.

**APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Não haverá qualquer tipo de despesa ao participante desta pesquisa ou ao seu familiar com materiais e testes para esta pesquisa. Ao assinar este termo de compromisso, o senhor (a) não está abrindo mão de seus direitos legais.

Através deste documento fica assegurado o direito ao senhor (a) \_\_\_\_\_ que terá todos os esclarecimentos relativos à pesquisa garantidos, incluindo a metodologia utilizada. A partir do momento em que o participante não desejar mais fazer parte da pesquisa, reservo-lhe o direito de retirar o seu consentimento, livre de sofrer qualquer penalidade ou danos quaisquer que sejam. Se no decorrer da pesquisa tiver alguma dúvida, poderá procurar o Dr. João Vinícius Salgado (tel 32730511/32399940/988681204).

**Consentimento**

Eu, \_\_\_\_\_, participante voluntário, dou consentimento livre e esclarecido, para que se façam as entrevistas e testes necessários a esta pesquisa e posterior uso e publicação dos dados nos relatórios finais e conclusivos, a fim de que estes sirvam para beneficiar a ciência e a humanidade. Declaro que recebi cópia do presente Termo de Consentimento.

Belo Horizonte, \_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 201\_\_.

Assinatura do participante: \_\_\_\_\_

DATA \_\_/\_\_/\_\_\_\_

Declaro que pessoalmente expliquei todos os detalhes da pesquisa.

Assinatura do Pesquisador: \_\_\_\_\_

DATA \_\_/\_\_/\_\_\_\_

**APÊNDICE B – QUESTIONÁRIO CLÍNICO E SÓCIO-DEMOGRÁFICO PACIENTES**

**Hospital de Ensino Instituto Raul Soares (IRS) - Ambulatório de Esquizofrenia**

<b>RG IRS</b>

**Protocolo de Pesquisa**

**Nome do paciente:** \_\_\_\_\_

**Critérios de Inclusão/Exclusão**

<b>Paciente</b>	
Critérios de Inclusão	
1)	Idade: >18 e <50
2)	Diagnóstico de Esquizofrenia <b>(F20)</b>
3)	Ausência de patologias neurológicas primárias (Epilepsia, Demências, Tumores, TCE grave, outras)
4)	Ausência de infecção pelo HIV/AIDS
5)	Ausência de critérios para uso nocivo/dependência de substâncias (exceto maconha)
6)	Estabilidade clínica informada no prontuário do paciente e pelos profissionais de saúde envolvidos
Critérios de Exclusão	
7)	Ter feito uso de anti-inflamatórios, corticoides, antivirais ou antibióticos nas 2 semanas anteriores
8)	Ter feito uso de bebidas alcoólicas na noite anterior ao teste
9)	Presença de demais desordens neuropsiquiátricas
10)	Presença de doença autoimune e infecções
11)	Paciente com algum tipo de distúrbio metabólico (seestão presentes 3 dos 5 critérios abaixo:)
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Obesidade central - circunferência da cintura superior a 88 cm na mulher e 102 cm no homem;</li> <li>• Hipertensão Arterial - pressão arterial sistólica 130 e/ou pressão arterial diastólica 85 mmHg;</li> <li>• Glicemia alterada (glicemia igual ou superior a 110 mg/dl) ou diagnóstico de Diabetes;</li> <li>• Triglicerídeos superior ou igual a 150 mg/dl;</li> <li>• HDL colesterol menor que 40 mg/dl em homens e 50 mg/dl em mulheres</li> </ul>

**Medicações psiquiátricas em uso:**

Medicamento	Dose	Código*	Eq. de Clorpromazina**

**APÊNDICE B – QUESTIONÁRIO CLÍNICO E SÓCIO-DEMOGRÁFICO – PACIENTES**

\* **Codificação:** 1. Típicos potentes (Haloperidol, Trifluoperazina); 2. Típicos sedativos (Clorpromazina, Levomepromazina, Periciazina, Tioridazina) e Prometazina; 3. Atípicos; 4. Clozapina; 5. Benzodiazepínicos; 6. Biperideno; 7. Estabilizadores do humor (Lítio, Ácido valpróico, Carbamazepina); 8. Lamotrigina e Topiramato; 9. Antidepressivos tricíclicos; 10. Outros antidepressivos.

\*\* **Eq. de Clorpromazina 100 mg** = Haloperidol 2mg; Haloperidoldecanoato 35mg (2/3 ampola); Trifluoperazina 5mg; Levomepromazina/Tioridazina/Periciazina 100mg; Risperidona 1,3mg; Clozapina 100mg; Olanzapina 5mg; Quetiapina 150mg; e Ziprasidona 50mg.

Critérios de inclusão preenchidos? 1. sim 2. não

Em caso de exclusão, motivo(s): \_\_\_\_\_

Observações: \_\_\_\_\_

**Dados Sócio-demográficos**

**Data de nascimento:** \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ **Idade:** \_\_\_\_\_

**Médico:** \_\_\_\_\_ **Data:** \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**Endereço:** \_\_\_\_\_

**Município:** \_\_\_\_\_ **Estado:** \_\_\_\_\_ **Telefone(s):** \_\_\_\_\_

**Nome da Mãe:** \_\_\_\_\_

**Naturalidade:** \_\_\_\_\_ **Procedência:** \_\_\_\_\_

**Gênero:** 1. Masculino 2. Feminino **Filhos:** 1. Sim 2. Não **Quantos:** \_\_\_\_\_

**Situação conjugal:** 1. Solteiro 2. Casado 3. União estável 4. Separado/divorciado 5. Viúvo

**Cor da pele:** 1. Branca 2. Negra 3. Pardo 4. Amarelo 5. Índio 6. Outro: \_\_\_\_\_

**Nível de escolaridade:** 1. NA 2. Fundamental incompleto 3. Fundamental completo 4. Médio Incompleto 4. Médio completo 5. Superior incompleto 6. Superior Completo 7. Pós-graduação

**Anos de estudo:** \_\_\_\_\_ **Repetência escolar:** 1. Sim 2. Não 99. NA **Quantas vezes:** \_\_\_\_\_

**Reside:** 1. Sozinho 2. Familiares

**Com quem:** 1. Cônjuge/companheiro 2. Pais 3. Filhos 4. Irmãos 5. Avós 6. Instituição 7. Outros: \_\_\_\_\_

**Ocupação atual:** 1. Desempregado 2. Empregado registrado 3. Empregado não registrado 4. Atividade não remunerada (voluntário) 5. Estudante 6. Aposentado 7. Outro: \_\_\_\_\_

**Renda familiar mensal (número de salários-mínimos):** 1. \_\_\_\_\_ 2. Não sabe

**Nº dependentes desta renda:** \_\_\_\_\_

**Situação previdenciária:** 1. Sem benefício 2. Auxílio-desemprego 3. Auxílio-doença 4. Aposentadoria por invalidez

Aposentadoria por tempo de serviço 6. Benefício de Prestação Continuada (LOAS) 7. Pensionista 8. Outras fontes de renda: \_\_\_\_\_

APÊNDICE B – QUESTIONÁRIO CLÍNICO E SÓCIO-DEMOGRÁFICO - PACIENTES

**Dados Clínicos**

**Diagnósticos psiquiátricos atuais (do prontuário):** \_\_\_\_\_

**Início da doença (1º surto psicótico) - idade:** \_\_\_\_\_

**Início do tratamento - idade:** \_\_\_\_\_

**Primeiro surto?** 1.Sim 2.Não

**Ingresso no ambulatório – mês/ano:** \_\_\_\_\_

**Nº de Internações:** 1.Último ano: \_\_\_\_\_ 2.Últimos 5 anos: \_\_\_\_\_ 3.Vida toda: \_\_\_\_\_

**Uso de substâncias (1.Sim 2.Não):**

	Atual	Quantidade	Pregresso	Quantidade
<b>1. Tabaco</b>				
<b>2. Álcool</b>				
<b>3. Maconha</b>				
<b>4. Cocaína/crack</b>				
<b>5. Outras</b>				

**Codificar quantidades:**

**Tabaco:** 1.até 10 cigarros/5 palheiros 2. 11-20c/6-10p 3. 21-40c/11-20p 4.>40c/20p  
**Álcool (U/semana):** vinho (12%) – 90ml = 10g = 1U; cerveja (5%) – 350ml = 17g = 1,7U; destilados (40%) – 50ml = 20g = 2U

**Cocaína/Crack:** gramas ou pedras/semana **Maconha:** 1. até 7cigarros/sem. 2. 8-14c/sem. 3.>14c/sem.

**Usou algum(s) do(s) medicamento(s) abaixo nas últimas 2 semanas?** 1.Sim. 2. Não

**Tipo** – 1.Analgésicos 2.Antiinflamatório 3.Antiviral 4.Antibiótico 5. Antidepressivo 6. Estabilizador de humor 7. Corticóide 8. Outros: \_\_\_\_\_ Dose e data de início/término: \_\_\_\_\_

**Possui alguma doença auto imune?** :1.Sim 2.Não

**Tipo** – 1.Lúpus Eritematoso Sistêmico 2.Artrite reumatóide 3.Psoríase 4.DM tipo I 5.Outras.Especificar:

**História de doenças Clínicas:** 1.Sim 2.Não

**Tipo** – 1.DM (tipo:\_\_) 2.HAS 3.Dislipidemia 4.Cardiopatias 5. IAM 6. Doença vascular periférica 7.Tireoidopias 8.Hepatite viral. (tipo:\_\_) 09. Úlcera péptica e/ou gastrite 10.Dislipidemia 11.Outras.Especificar:

**História de doenças Neurológicas:** 1.Sim 2.Não

**Tipo** – 1.Epilepsia 2.Demências 3.TCE 4.TU cerebral 5.Outras Especificar: \_\_\_\_\_

**APÊNDICE B – QUESTIONÁRIO CLÍNICO E SÓCIO-DEMOGRÁFICO - PACIENTE**

**Saúde da mulher:**

Se mulher, faz uso de anticoncepcional? 1. Sim 2. Não 99. NA Nome e tempo de uso(meses): \_\_\_\_\_

Possui filhos? 1.sim 2.não Quantos? \_\_\_\_\_

**Como é sua resposta frente a uma infecção (ex. resfriado/gripe)?**

1. Número de episódios/ano (últimos 5 anos): 1. \_\_\_\_\_ 2. Não sabe

2. Tempo médio por episódio (em dias): 1. \_\_\_\_\_ 2. Não sabe

**Já teve alguma doença mais grave, como câncer?** 1. Sim 2. Não

**Propedêutica de rastreamento de câncer nos últimos 5 anos:**

Para Mulheres:	Quantidade	Para Homens:	Quantidade
( ) Exame de Papanicolau		( ) Exame de toque retal	
( ) Mamografia		( ) PSA	
( ) Autoexame de mamas		( ) Colonoscopia	
( ) US pélvico			
( ) Colonoscopia			

**Algum membro da família com algum transtorno psiquiátrico ou câncer?** 1.Sim 2.Não

(Marcar X se positivo) (M: materno/P: paterno)

	Esquizofrenia	THB	Depressão	Suicídio	Abuso de Substância	Câncer
1.Pai						
2.Mãe						
2.Irmãos						
3.Filhos						
4.Tios (M/P)						
5.Avós (M/P)						

Obs: registrar o tipo de câncer

**Pratica alguma atividade física?** 1. Sim 2. Não

Atividade	Intensidade (min/dia)	Frequência (vezes/semana)
Caminhada		
Corrida		
Bicicleta		
Musculação		
Natação		
Outros		

## APÊNDICE B – QUESTIONÁRIO CLÍNICO E SÓCIO-DEMOGRÁFICO - PACIENTE

**Antropometria:**Peso: \_\_\_\_\_ (Kg)    Altura: \_\_\_\_\_ (m)    IMC ( $P/(A)^2$ ): \_\_\_\_\_

Circ. Abd.: \_\_\_\_\_ (cm)    PA \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ mmHg

## APÊNDICE C – QUESTIONÁRIO CLÍNICO E SÓCIO-DEMOGRÁFICO - CONTROLES

Hospital de Ensino Instituto Raul Soares - Ambulatório de Esquizofrenia

RG IRS

Protocolo de Pesquisa

Nome: \_\_\_\_\_

**Critérios de Inclusão/Exclusão**

<b>Controle</b>	
Critérios de Inclusão	
<b>12)</b>	Idade: >18 e <50
<b>13)</b>	Ausência de patologias neurológicas primárias (Epilepsia, Demências, Tumores, TCE grave, outras)
<b>14)</b>	Ausência de transtorno psiquiátrico atual Ausência de infecção pelo HIV/AIDS
<b>15)</b>	Ausência de critérios para uso nocivo/dependência de substâncias (exceto maconha)
Critérios de Exclusão	
<b>16)</b>	Ter feito uso de anti-inflamatórios, corticoides, antivirais ou antibióticos nas 2 semanas anteriores
<b>17)</b>	Ter feito uso de bebidas alcoólicas na noite anterior ao teste
<b>18)</b>	Estar sob o uso de antidepressivos e/ou estabilizadores do humor
<b>19)</b>	Presença de doença autoimune e infecções
<b>20)</b>	<u>Familiar de 1º grau com EQZ</u>
<b>21)</b>	Estar com algum tipo de distúrbio metabólico (Marcar sim se estão presentes 3 dos 5 critérios abaixo:)
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Obesidade central - circunferência da cintura superior a 88 cm na mulher e 102 cm no homem;</li> <li>• Hipertensão Arterial - pressão arterial sistólica 130 e/ou pressão arterial diastólica 85 mmHg;</li> <li>• Glicemia alterada (glicemia igual ou superior a 110 mg/dl) ou diagnóstico de Diabetes;</li> <li>• Triglicérides superior ou igual a 150 mg/dl;</li> <li>• HDL colesterol menor que 40 mg/dl em homens e 50 mg/dl em mulheres</li> </ul>

Critérios de inclusão preenchidos? 1.sim 2.não

Em caso de exclusão, motivo(s): \_\_\_\_\_

Observações: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**APÊNDICE C – QUESTIONÁRIO CLÍNICO E SÓCIO-DEMOGRÁFICO - CONTROLES**

**Dados Sócio-demográficos**

**Data de nascimento:** \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ **Idade:** \_\_\_\_\_

**Endereço:** \_\_\_\_\_

**Município:** \_\_\_\_\_ **Estado:** \_\_\_\_\_ **Telefone(s):** \_\_\_\_\_

**Nome da Mãe:** \_\_\_\_\_

**Naturalidade:** \_\_\_\_\_ **Procedência:** \_\_\_\_\_

**Gênero:** 1. Masculino 2. Feminino **Filhos:** 1. Sim 2. Não **Quantos:** \_\_\_\_\_

**Situação conjugal:** 1. Solteiro 2. Casado 3. União estável 4. Separado/divorciado 5. Viúvo

**Cor da pele:** 1. Branca 2. Negra 3. Pardo 4. Amarelo 5. Índio 6. Outro: \_\_\_\_\_

**Nível de escolaridade:** 1. NA 2. Fundamental incompleto 3. Fundamental completo 4. Médio Incompleto

4. Médio completo 5. Superior incompleto 6. Superior Completo 7. Pós-graduação

**Anos de estudo:** \_\_\_\_\_ **Repetência escolar:** 1. Sim 2. Não 99. NA **Quantas vezes:** \_\_\_\_\_

**Reside:** 1. Sozinho 2. Familiares

**Com quem:** 1. Cônjuge/companheiro 2. Pais 3. Filhos 4. Irmãos 5. Avós 6. Instituição 7. Outros: \_\_\_\_\_

**Ocupação atual:** 1. Desempregado 2. Empregado registrado 3. Empregado não registrado

4. Atividade não remunerada (voluntário) 5. Estudante 6. Aposentado 7. Outro: \_\_\_\_\_

**Renda familiar mensal (número de salários-mínimos):** 1. \_\_\_\_\_ 2. Não sabe **Nº dependentes desta renda:** \_\_\_\_\_

**Situação previdenciária:** 1. Sem benefício 2. Auxílio-desemprego 3. Auxílio-doença 4. Aposentadoria por invalidez

5. Aposentadoria por tempo de serviço 6. Benefício de Prestação Continuada (LOAS) 7. Pensionista 8. Outras fontes de renda: \_\_\_\_\_

**Dados Clínicos**

**Você já teve algum transtorno psiquiátrico?** 1. sim 2. não **Qual?** \_\_\_\_\_

**Você tem atualmente algum transtorno psiquiátrico?** 1. sim 2. não **Qual?** \_\_\_\_\_

**Você faz uso crônico de algum medicamento?** 1. sim 2. não **Qual?** \_\_\_\_\_

**Uso de substâncias** (1. Sim 2. Não):

	Atual	Quantidade	Progresso	Quantidade
<b>1. Tabaco</b>				
<b>2. Álcool</b>				
<b>3. Maconha</b>				
<b>4. Cocaína/crack</b>				
<b>5. Outras</b>				

**Codificar quantidades:**

**Tabaco:** 1. até 10 cigarros/5 palheiros 2. 11-20c/6-10p 3. 21-40c/11-20p 4. >40c/20p

**APÊNDICE C – QUESTIONÁRIO CLÍNICO E SÓCIO-DEMOGRÁFICO - CONTROLES**

**Álcool (U/semana):** vinho (12%) – 90ml = 10g = 1U; cerveja (5%) – 350ml = 17g = 1,7U; destilados (40%) – 50ml = 20g = 2U      **Cocaína/Crack:** gramas ou pedras/semana      **Maconha:**1. até 7cigarros/sem. 2. 8-14c/sem.3.>14c/sem.

**Usou algum(s) do(s) medicamento(s) abaixo nas últimas 2 semanas?** 1.Sim. 2. Não

Tipo – 1.Analgésicos 2.Antiinflamatório 3.Antiviral 4.Antibiótico 5. Antidepressivo6. Estabilizador de humor7. Corticóide8. Outros: \_\_\_\_\_

Dose e data de início/término: \_\_\_\_\_

**Possui alguma doença auto imune?** :1.Sim 2.Não

Tipo – 1.Lúpus Eritematoso Sistêmico 2.Artrite reumatóide 3.Psoríase 4.DM tipo I5.Outras. Especificar:

**História de doenças Clínicas:**1.Sim 2.Não

Tipo – 1.DM (tipo:\_\_) 2.HAS 3.Dislipidemia 4.Cardiopatas 5. IAM 6. Doença vascular periférica 7.Tireoidopatas 8.Hepatite viral. (tipo:\_\_) 09. Úlcera péptica e/ou gastrite 10.Dislipidemia 11.Outras. Especificar:

**História de doenças Neurológicas:**1.Sim 2.Não

Tipo – 1.Epilepsia 2.Demências 3.TCE 4.TU cerebral 5.Outras.Especificar:

**Saúde da mulher:**

Se mulher, faz uso de anticoncepcional? 1. Sim. Nome e tempo (meses): \_\_\_\_\_2. Não

Possui filhos? 1.sim 2.não      Quantos? \_\_\_\_\_

**Como é sua resposta frente a uma infecção (ex. resfriado/gripe)?**

1.Número de episódios/ano (últimos 5 anos): 1.\_\_\_\_\_ 2. Não sabe

2.Tempo médio por episódio (em dias): 1.\_\_\_\_\_ 2. Não sabe

**Já teve alguma doença mais grave, como câncer?** 1. Sim2. Não

**Propedêutica de rastreamento de câncer nos últimos 5 anos:**

Para Mulheres:	Quantidade	Para Homens:	Quantidade
( ) Exame de Papanicolau		( ) Exame de toque retal	
( ) Mamografia		( ) PSA	
( ) Autoexame de mamas		( ) Colonoscopia	
( ) US pélvico			
( ) Colonoscopia			

**APÊNDICE C – QUESTIONÁRIO CLÍNICO E SÓCIO-DEMOGRÁFICO - CONTROLES**

**Algum membro da família com algum transtorno psiquiátrico ou câncer?** 1.Sim 2.Não

(Marcar X se positivo) (M: materno/P: paterno)

	Esquizofrenia	THB	Depressão	Suicídio	Abuso de Substância	Câncer
1.Pai						
2.Mãe						
2.Irmãos						
3.Filhos						
4.Tios (M/P)						
5.Avós (M/P)						

Obs: registrar o tipo de câncer

**Pratica alguma atividade física?** 1. Sim 2. Não

Atividade	Intensidade (min/dia)	Frequência (vezes/semana)
Caminhada		
Corrida		
Bicicleta		
Musculação		
Natação		
Outros		

**Antropometria:**

Peso: \_\_\_\_\_ (Kg)    Altura: \_\_\_\_\_ (m)    IMC ( $P/(A)^2$ ): \_\_\_\_\_

Circ. Abd.: \_\_\_\_\_ (cm)    PA \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ mmHg

APÊNCIDE D – PROTOCOLO DE TODAS AS ETAPAS PARA AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE  
RESPOSTA DIFERENCIAL DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (CMSP)  
DE PACIENTES E CONTROLES

### 1) Coleta de sangue periférico

A coleta de sangue periférico deve ser realizada seguindo todas as normas corretas de assepsia e punção venosa. O ideal é preparar uma maletinha individual a ser levada para o Instituto Raul Soares (IRS). O sangue coletado deve ser levado à temperatura ambiente para o Laboratório Interdisciplinar de Investigação Médica (LIIM).

#### Material de coleta:

- ✓ Álcool 70%
- ✓ Algodão
- ✓ Luva
- ✓ Garrote
- ✓ 3 tubos a vácuo (VACUNAINERS) de 10 mL com heparina (tampa verde) – 2 tubos serão para coleta do anel de PBMC e 1 tubo para **coleta de plasma, que será analisado no CBA**
- ✓ 1 tubo a vácuo (VACUNAINERS) de 6 mL (tampa vermelha) - **para coleta de soro, que será analisado para avaliação de marcadores lipídicos**
- ✓ Agulha verde ou preta (de maior calibre) – usar a preta apenas em homens de vasos MUITO calibrosos. A verde é menos calibrosa, mas fornece punção mais tranquila e menos dolorosa.
  - ✓ Canhão para a agulha
  - ✓ Caneta de tinta permanente ponta fina (para identificação dos tubos a vácuo)

### 2) Preparação de soluções

No primeiro dia de experimento/coleta de sangue, preparar soluções estéreis de PBS (1-2 Litros) e PRMI (1Litro). Antes do preparo, colocar na capela da sala de cultura: 1 filtro estéril lacrado, 3 potes de vidro de 500mL (tampa azul) e ponta da mangueira da bomba a vácuo. Ligar a luz UV da capela para esterilização do material e desliga-la após 15 min.

**Obs. Todas as etapas deste protocolo devem ser realizadas de luvas, jaleco e cabelo preso. Levar canetas de tinta permanente (ponta grossa e ponta fina).**

### **Do preparo do Roswell Park Memorial Institute (RPMI) INCOMPLETO**

1. Coletar 1 Litro de água Mili-Q em um béquer de vidro;
2. Colocar aprox.. 900 ml no agitador e adicionar 1 frasco de RPMI;
3. Após completa diluição, acertar o pH da solução (pH ideal entre 7,2 a 7,4) no pHmetro. Para isto, diminuir o pH se necessário adicionando HCl, de gota em gota, devagar. À medida que a solução vai se aproximando do pH ideal, vai se tornando avermelhada. Se possível, deixar a solução em 7,3, dado que ela tende a se tornar mais básica com o passar do tempo;
4. Com o pH entre 7,2 a 7,4, completar o volume da solução para 1L na proveta de vidro;
5. Colocar o pHmetro em stand-by.

*Orientações importantes sobre o pHmetro:* deve ser calibrado 1x/dia, não esquecer de lavar e secar delicadamente e sem esfregar o eletrodo de vidro, ao final do uso, manter o eletrodo (bolinha azul) SEMPRE mergulhada no KCl

### **Do preparo do PBS 1X**

No LIIM há uma solução estoque de PBS **10X**. Usá-la para o preparo do PBS 1x.

1. Colocar exatamente 900 ml de água mili-Q na proveta de vidro e completar o volume para 1000 ml (1L) com o PBS **10X**;
2. - Regular o pH para 7,2 a 7,4;
3. Desligar o pHmetro, limpá-lo adequadamente, organizar/limpar a bancada, e lavar a vidraria utilizada.

*Obs.* Vidraria lavar com água abundante (enxaguar 5x), não usar detergente, pois algum detergente residual poderia levar à lise celular em experimentos futuros. Descartes podem ser lavados com detergentes e são secados separadamente. Não esquecer que o agitador magnético utilizado deve ser lavado, seco e guardado exatamente após o final do uso. Deixa-lo secando o estraga!)

### **Da esterilização das soluções preparadas**

A esterilização é realizada na sala de cultura através de filtração, com o material previamente esterilizado na luz UV.

1. Passar álcool 70% nas luvas e se posicionar na capela;

2. Encaixar no filtro a ponta da mangueira estéril da bomba à vácuo e um frasco de vidro;
3. Colocar 500 ml de PBS na parte superior do filtro;
4. Ligar a bomba à vácuo;
5. Após completa filtragem, desligar bomba, trocar frasco de vidro e repetir passos 3 e 4;
6. Filtrar em seguida solução de RPMI da mesma forma. Obs. Filtrar parte do RPMI no frasco original do filtro;
7. Etiquetar soluções (usar fita crepe);
8. Descartar filtro no lixo infectante (vermelho) debaixo da pia.

As soluções até então vistas serão preparadas 1 única vez e utilizadas durante todo o projeto. Por isto devem ser bem etiquetadas e armazenadas.

---

## EXPERIMENTO

**O experimento é realizado em 2 dias seguidos.** No primeiro dia é realizada a coleta de sangue, obtenção do anel de PBMC, de plasma, contagem e separação de células para Western Blot, e plaqueamento das células. 24 horas (**protocolamos como 22 horas**) após adição de estímulo Phytohaemaglutinin 1% (PHA 1%), amostras são centrifugadas, e sobrenadante pipetado e armazenado a -20°C.

### A) Primeiro dia do experimento

Ao chegar no laboratório, passar álcool 70% na capela e colocar em seu interior:

- falcons 15 ml;
- frasco de vidro com eppendorfs;
- ponteiras amarelas e azuis (200 e 1000µL) estéreis e pipetas correspondentes;
- descarte com hipoclorito 1%;
- Ficoll da geladeira escrito "ABERTO NO FLUXO".

Obs. Antes de colocar na capela borrifar álcool em tudo!

- Em seguida, ligar UV por 10 minutos
- Conferir se estufa está com água suficiente
  - Retirar do Freezer 1: DMSO, soro humano inativado, e a solução de

antimicótico + antibiótico

DEIXAR O FLUXO DA CAPELA LIGADO, LUZ APAGADA, E IR COLETAR O SANGUE DE PACIENTES E CONTROLES.

**Obtenção de PBMC (células mononucleares do sangue periférico)**

- 1) Pegar 2 tubos com sangue (10 ml cada) e vertê-los em 2 falcons de 50 ml;
- 2) Adicionar 10 mL de PBS estéril (proporção 1:1 de sangue e PBS);
- 3) Em outro tubo falcon de 50 ml adicionar 10 ml de Ficoll (agora já em temperatura ambiente);
- 4) Verter vagarosamente o sangue+PBS no Ficoll, NÃO MEXER/MISTURAR AS SOLUÇÕES;  
ANTES DESTA ESTAPA 4 CONFERIR SE A CENTRÍFUGA ESTÁ SENDO OU NÃO USADA POR ALGUÉM, **E SE ESTÁ À 21°C. CASO NEGATIVO, AGUARDE.** Apenas verter o sangue+PBS no Ficoll com a centrífuga disponível e à 21°C, para evitar do sangue misturar ao Ficoll (que é citotóxico, e a espera leva à perda da GRANDE MAIORIA das células coletadas);
- 5) **Primeira** centrifugação a 1200rpm, 21°C, 40 min, aceleração 9, desaceleração 4;

**Obs.** Aqui é um momento para aproveitar o intervalo grande desta centrifugação de 40 minutos para preparar: **Soluções intermediárias (SI)** de Rapa, LY, AS e CHIR a partir de soluções estoques (SE), meio COMPLETO, droga (Rapa, LY, AS, CHIR) + meio COMPLETO.

Se possível, já identificar os eppendorfs que serão armazenados o **soro e plasma** dos pacientes e controles - veja abaixo.

- 6) Retirar com cuidado o anel de PBMC e colocar em outro falcon de 50 ml;
- 7) Completar o volume para 35 ml com PBS1X;
- 8) **Segunda** centrifugação a 1500rpm, 4°C, 7 min, aceleração 9, desaceleração 7;
- 9) Verter o sobrenadante;
- 10) Ressuspender o pellet (dar “batidinhas”);
- 11) Adicionar 35 ml de PBS1X;

12) **Terceira** centrifugação a 1500rpm, 4°C, 7 min, aceleração 9, desaceleração 7;

**Obs.** Enquanto continua o protocolo, aproveitar que a centrífuga está a 4°C e deixar centrifugando o **soro** (para avaliação lipídica) e **plasma** (para o CBA) - centrífuga a 3000 rpm, 4°C, por 10 minutos.

**Quando possível** identificar eppendorfs, pipetar o plasma e soros armazená-los na geladeira.

**(soro – do tubo com tampa vermelha. Fazer 5 alíquotas de 500µL; e plasma – do tubo com heparina, tampa verde. Fazer as alíquotas possíveis)**

13) Verter o sobrenadante e pipetar a última gota, mantendo o pellet no tubo;

14) Ressuspender o pellet (dar “batidinhas”);

15) Adicionar 1mL de RPMI COMPLETO;

16) Fazer a contagem de células na câmara de Neubauer e acertar para  $1 \times 10^7$

### Contagem de células

Para contagem de células, identificar falcons com Px e Cx e adicionar:

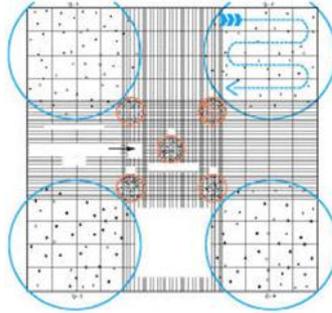
10 µL de célula (já deixar ponteira no eppendorf)

190 µL de corante azul de trypan ou PBS

- Pipetar 10 µL desta solução com a ponteira que deixou no eppendorf e adicionar na câmara de Neubauer espelhada

- Com ajuda de um contador, conte no microscópio (aumento de 10x ou 20x) o número de células nos 4 quadrantes, fazendo o cálculo de média:

Ex. P1(Paciente1) =  $(140 + 138 + 162 + 126 \text{ células em cada quadrante}) \% 4$   
quadrantes = 141,5 células



### Representação da câmara de Neubauer

Obs: células brilham!

#### Cálculo para acertar o número de células:

Número de Células Totais (N) = n (média de células dos quadrantes) x Fator de Diluição (20) x  $10^4$

$141,4 \text{ células} \times 20 \times 10^4 = 2820,0 \times 10^4 = \mathbf{2,820 \times 10^7}$      subtrair deste valor  $1,0 \times 10^7$  para obter a quantidade de meio a adicionar para acertar o número de células  
 $2,820 \times 10^7 - 1,0 \times 10^7 = 1,8 \text{ ml de RPMI}$

Adicionar 1,8 ml de RPMI INCOMPLETO no falcon

- Fazer o mesmo para os outros falcons de células.
- Em seguida, preparar RPMI COMPLETO para o plaqueamento de células.

#### Plaqueamento de células

O plaqueamento é feito com as **Soluções intermediárias (SI)** em placas de fundo em U.

Para preparar **Soluções intermediárias (SI)** a partir de soluções estoques (SE):

**Rapamicina**     Preparar concentrações 2,5 e 0,5 nM ( $10^{-9}$ ) (**SE:  $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$** )

Para preparar C1: 6,6  $\mu\text{L}$  SE + 13,4  $\mu\text{L}$  DSMO

Para preparar C2: 1,32  $\mu\text{L}$  SE + 18,7  $\mu\text{L}$  DSMO

**LY 294002**     Preparar concentrações 10 e 1 nM (**SE:  $5 \times 10^{-3} \text{ M}$** )

Para preparar C1: 13,3  $\mu\text{L}$  SE + 6,7  $\mu\text{L}$  DSMO

Para preparar C2: 1,3  $\mu\text{L}$  SE + 18,7  $\mu\text{L}$  DSMO

**AS**     Preparar concentrações 1 e 0,1 nM ( $10^{-6}$ )

Para preparar C1: 6,7µL SE + 13,3 µL DMSO

Para preparar C2: 2µL **de C1** + 18,0 µL DMSO

**CHIR 99021** Preparar concentrações 3 e 1 nM ( $10^{-9}$ )

Para preparar C1: 6,6µL SE + 13,4 µL DMSO

Para preparar C2: 2,2µL SE + 17,8 µL DMSO

Obs. Veja como chegamos a estes valores nas contas representadas ao final deste protocolo.

C1 é a maior concentração e C2 a menor.

### **Preparo do meio (RPMI) COMPLETO**

O meio completo contém: 10% de soro humano, 1% da solução de antibiótico + antimicótico.

Portanto, para preparar 50 ml de RPMI COMPLETO adicionar:

- 5 ml de soro humano
- 0,5 ml (500 µL) de antibiótico
- 0,5 ml (500 µL) de antimicótico
- Completar o volume para 50 mL utilizando o RPMI INCOMPLETO.

Obs. As soluções acima serão SEMPRE PREPARADAS DESTA FORMA. **Já os cálculos de PHA 1% e de droga (Rapa, LY,AS,CHIR) + meio DEVERÃO SER REFEITOS A CADA EXPERIMENTO**, pois depende do número de pacientes/controles do dia.

**O plaqueamento então será realizado da seguinte forma:**

- 1) Adicionar 160 µL de droga (Rapa, LY, AS, CHIR + meio completo, = a 0,6 µL de droga + 159,4 µL **meio completo**);
- 2) Adicionar 20 µL de célula (PBMC) na concentração de  $1 \times 10^7$ ;
- 3) Adicionar 20 µL de estímulo (PHA) (2 µL de PHA + 18 µL **meio completo**) ou apenas meio completo.

Para 3 pessoas serão 2 placas desta forma abaixo. As 2 placas são iguais, exceto pelo fato de que em uma delas é aplicado ao final 20  $\mu\text{L}$  de meio e em outra 20  $\mu\text{L}$  de PHA. Caso no dia tenha só 2 pessoas, fazer as 2 em 1 placa só.

Laboratório Interdisciplinar de Investigação Médica - LIIM

NOME DO EXPERIMENTO: \_\_\_\_\_  
 RESPONSÁVEL: \_\_\_\_\_ DATA: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
$P_x$ <	A	PHA ou Meio		CHIR	LY		AS	RAPA				
	B		1	2	1	2	1	2	1	2		
$P_x$ <	C											
	D											
$C_x$ <	E											
	F											
	G											
	H											

Para as adições nos poços/wells, primeiro calcular o volume total que preciso distribuir em todos os poços do dia.

**1)** Adicionar 160  $\mu\text{L}$  de droga (Rapa, LY, AS, CHIR) + meio  
 Colocar 0,6  $\mu\text{L}$  de droga + 159,4  $\mu\text{L}$  meio em cada poço/well  
 0,6  $\mu\text{L}$  de droga ----- 1 well(200  $\mu\text{L}$ )  
 X  $\mu\text{L}$  de droga----- x well de 1 [] de cada droga(ex 15 well se 3 pessoas – cada pessoa, 4 well pq são 2 placas)  
 X = 15 x 0,6 = 9  $\mu\text{L}$  de droga

159,4  $\mu\text{L}$  de meio ----- 1 well(200  $\mu\text{L}$ )  
 X  $\mu\text{L}$  de droga----- x well de 1 [] de cada droga(ex 15 well se 3 pessoas – cada pessoa, 4 well pq são 2 placas)  
 X = 15 x 159,4 = 2.391  $\mu\text{L}$  de meio completo

Assim, para preparar drogas para 3 pessoas: 2391  $\mu\text{L}$  de meio + 9  $\mu\text{L}$  droga. Fazer esta preparação para cada concentração de cada droga. Em seguida, pipetar 160  $\mu\text{L}$  desta solução e adicionar em cada poço, na vertical, em duplicata.

**2)** Adicionar 20  $\mu\text{L}$  de célula (PBMC) na concentração de  $1 \times 10^7$

- Assim, pipetar 20  $\mu\text{L}$  de PBMC e adicionar em cada poço, na horizontal, em duplicata.
- Conferir se todos os poços estão com célula (poços com célula ficam mais opacos se vistos contra a luz)
- Colocar a(s) placa(s) na estufa de  $\text{CO}_2$  e deixar por 30 minutos, para que as drogas e células interajam por um tempo

**No intervalo dos 30 minutos, armazenar células que sobraram para o Western Blot e preparar o PHA 1 %**

**Para armazenamento das células que sobraram para o Western Blot:**

- Identificar eppendorfs, anotar quantidade, centrifugar na centrífuga (rotor para eppendorf fica dentro do armário) em 3000rpm, 5 minutos, a  $4^\circ\text{C}$ ;
- Descartar o sobrenadante e congelar o pellet.
- **Se não teve tempo de aliquotar o soro e o plasma antes, o momento é agora!**

**Para preparar Phytohemagglutinin (PHA) 1% :**

Para cada 200  $\mu\text{L}$ /well, colocar 2  $\mu\text{L}$  de PHA ( $1/100 = 2/200$ )

Então, a primeira coisa é calcular quantos poços (well) eu tenho no dia

Para cada pessoa, eu tenho 18 well , logo, 3 pessoas – 54 well por placa (fazer 60 por segurança, para não “ficar a conta”)

2  $\mu\text{L}$  de PHA ----- 1 well(200  $\mu\text{L}$ )

X  $\mu\text{L}$  de PHA ----- x well do dia (ex 54 well se 3 pessoas)

X = 54 x 2  $\mu\text{L}$  de PHA = 108  $\mu\text{L}$  de PHA (fazer 120 por segurança)

Colocar 18  $\mu\text{L}$  de meio + 2  $\mu\text{L}$  de PHA em cada poço/well de 200  $\mu\text{L}$  (em cada poço, 20 $\mu\text{L}$  de meio + PHA)

18  $\mu\text{L}$  de meio ----- 1 well(200  $\mu\text{L}$ )

X  $\mu\text{L}$  de meio ----- x well do dia (ex 54 well se 3 pessoas) – (60 por segurança)

X = 60 x 18 = 1080  $\mu\text{L}$  de meio

Assim, para preparar PHA 1% para 3 pessoas: 1080  $\mu\text{L}$  de meio **RPMI COMPLETO**  
+ 120  $\mu\text{L}$  PHA

- Após os 30 minutos, tirar as placas da estufa e em uma adicionar PHA 1% em todos os poços. Na outra placa, será adicionado meio completo em todos os poços.

**3)** Adicionar 20  $\mu$ L de estímulo (PHA) ou meio (RPMI) (2  $\mu$ L de PHA + 18  $\mu$ L meio)

- Após adicionar 20  $\mu$ L de PHA em todos os poços de uma placa e 20  $\mu$ L de meio na outra placa, conferir o horário. 22 horas depois, começará o segundo dia do experimento.

Limpar com álcool 70% e organizar todo material utilizado. Material do descarte contaminado com sangue deve ser previamente enxaguado na pia com escorredor e colocado para ser descartado nas lixeiras embaixo da pia.

### **B) Segundo dia do experimento**

Começa 22 horas depois da adição do PHA nas placas. No entanto, chegar um pouco mais cedo para fazer a identificação dos eppendorfs com caneta de tinta permanente.

Siglas padronizadas:

**P** = Paciente

**C** = Controle

**1** = maior concentração da droga

**2** = menor concentração da droga

**A** = CHIR

**B** = LY

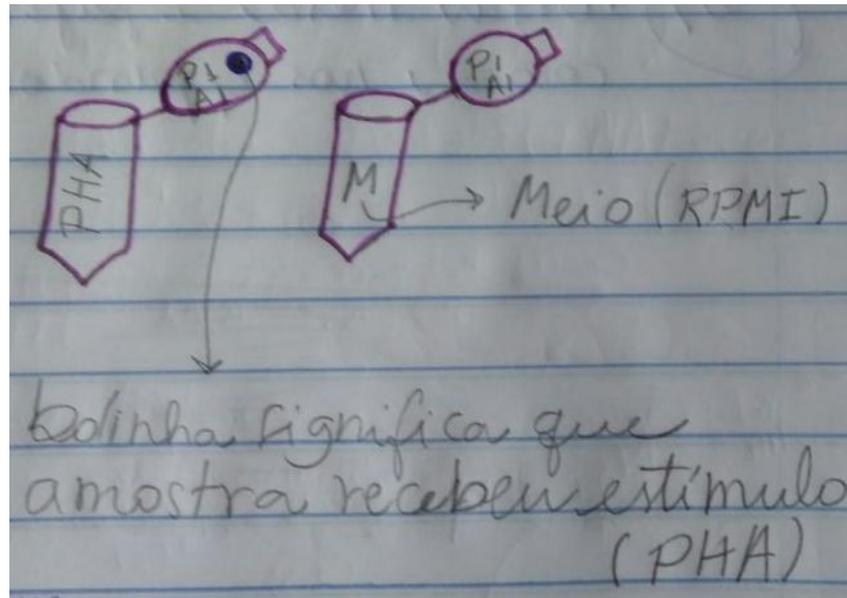
**C** = AS

**D** = Rapamicina

**Com bolinha e escrito PHA ao lado** = recebeu estímulo (PHA)

**Sem bolinha e escrito M ao lado** = recebeu meio COMLETO (M)

Exemplo de identificação dos eppendorffs.:



1. Limpar com álcool e forrar mesa;
  2. Identificar eppendorffs corretamente e conferir se seguem a mesma ordem da identificação das placas conforme desenha acima;
  3. Separar descarte com Hipoclorito 2%;
  4. **Obs. 15 minutos antes da centrifugação, programar a centrífuga, fechá-la e apertar Start 1X. Assim, a centrífuga vai refrigerando...**
  5. Centrifugar as placas na configuração 1300 rpm, 7 minutos, 4°C, AC 9, DES 5 (utilizar o rotor de placas que fica dentro do armário);
  6. Pipetar 180 µL do sobrenadante e colocar nos eppendorffs identificados (as células estimuladas produziram citocinas que se encontram no sobrenadante). Os 2 poços da mesma concentração são pipetados em 1 único eppendorf;
  7. Armazenar amostras no -20°C;
  8. Descartar as placas vazias no lixo infectante vermelho embaixo da pia (não precisa enxaguá-las);
-

**PARA ENTENDER**

**Contas da preparação das soluções intermediárias (SI) a partir de soluções estoques (SE):**

C1 = maior concentração

C2 = menor concentração

Taxa diluição:  $200 \mu\text{L}/0,6 \mu\text{L} = 333,3$

**Rapamicina** Preparar concentrações 2,5 e 0,5 nM ( $10^{-9}$ ) (**SE:  $2,5 \times 10^{-3}$  mol/L**)

$$C1 = 2,5 \times 10^{-9} \times 333,3 = 8,3 \times 10^{-7}$$

$$C_i \times V_i = C_f \times V_f$$

$$2,5 \times 10^{-6} \times V_i = 8,3 \times 10^{-7} \times 20$$

$$V_i = 6,6 \mu\text{L}$$

Para preparar 20  $\mu\text{L}$  de C1: 6,6 $\mu\text{L}$  SI + 13,4  $\mu\text{L}$  DSMO

$$C2 = 0,5 \times 10^{-9} \times 333,3 = 1,65 \times 10^{-7}$$

$$C_i \times V_i = C_f \times V_f$$

$$2,5 \times 10^{-6} \times V_i = 1,65 \times 10^{-7} \times 20$$

$$V_i = 1,32 \mu\text{L}$$

Para preparar 20  $\mu\text{L}$  de C2: 1,32 $\mu\text{L}$  de **SI** + 18,7  $\mu\text{L}$  DSMO

**LY 294002** Preparar concentrações 10 e 1 nM (**SE:  $5 \times 10^{-3}$  M**)

$$1 \text{ mol} \text{ ----- } 307,3\text{g}$$

$$5 \times 10^{-3} \text{ ----- } X \quad X = 0,307 \text{ mg} \quad \text{pesar } 1,54\text{mg de LY}$$

$$C1 = 10 \times 10^{-6} \times 333,3 = 3,33 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$$

$$C_i \times V_i = C_f \times V_f$$

$$5 \times 10^{-3} \times V_i = 3,33 \times 10^{-3} \times 20$$

$$V_i = 13,3 \mu\text{L}$$

Para preparar 20  $\mu\text{L}$  de C1: 13,3 $\mu\text{L}$  **SE** + 6,7  $\mu\text{L}$  DSMO

$$C2 = 13,3 / 10 = 1,33$$

Para preparar 20  $\mu\text{L}$  de **SE**: 1,3 $\mu\text{L}$  SE + 18,7  $\mu\text{L}$  DSMO

**AS** Preparar concentrações 1 e 0,1  $\mu\text{M}$  ( $10^{-6}$ )

Para preparar C1: 6,7 $\mu\text{L}$  **SE** + 13,3  $\mu\text{L}$  DSMO

Para preparar C2: 2 $\mu\text{L}$  **de C1** + 18,0  $\mu\text{L}$  DSMO

**CHIR 99021** Preparar concentrações 3 e 1 nM

$$C1 = 3 \times 10^{-6} \times 333,3 = 3 \times 10^{-4} \times 3,33 = 9,99 \times 10^{-4}$$

$$C_i \times V_i = C_f \times V_f$$

$$3 \times 10^{-3} \times V_i = 9,99 \times 10^{-3} \times 20$$

$$V_i = 6,6\mu\text{L}$$

Para preparar C1: 6,6 $\mu\text{L}$  **SE** + 13,4  $\mu\text{L}$  DSMO

$$C2 = 6,6 / 3 = 2,2$$

Para preparar C2: 2,2  $\mu\text{L}$  **SE** + 17,8  $\mu\text{L}$  DSMO

**Protocolo realizado por Vívian Thaise da Silveira**  
**Última atualização em 15/03/2018**  
**Orientador: Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira**  
**Laboratório de Neurofarmacologia ICB/UFMG**

APÊNDICE E – ANOVAS SEGUIDAS DE TESTE POSTHOC TUKEY

Representação Estatística Geral da Resposta Média de um Grupo de Indivíduos (Pacientes com Esquizofrenia e Controles Saudáveis) Frente a um Estímulos Diferentes:

1) Controle IL-17

Anova-modelo misto				
FV	Df	SQ	F	p
Tratamento	5	48	2.958	0.0208
Tukey				
Contraste	Estimativa	Erro Padrao	GL	valor p
A1PHA - A1	-62.6073	21.737	48	0.0618
A2 - A1	-9.93636	21.737	48	0.9973
MEIO - A1	-5.93355	22.372	48	0.9998
PHA - A1	-24.9394	22.372	48	0.8729
A2PHA - A1PHA	7.207273	21.737	48	0.9994
MEIO - A1PHA	56.67372	22.372	48	0.1349
PHA - A1PHA	37.66786	22.372	48	0.549
A2PHA - A2	-45.4636	21.737	48	0.3089
MEIO - A2	4.00281	22.372	48	1
PHA - A2	-15.0031	22.372	48	0.9844
MEIO - A2PHA	49.46645	22.372	48	0.2518
PHA - A2PHA	30.46059	22.372	48	0.7492
PHA - MEIO	-19.0059	23.013	48	0.9612

2) SCZ IL 17

Anova-modelo misto				
FV	Df	SQ	F	p
Tratamento	5	50	3.55219	0.008
Tukey				
Contraste	Estimativa	Erro Padrao	GL	valor p
A1PHA - A1	-150.535	47.26	50	0.0284
A2 - A1	-2.82364	47.26	50	1
MEIO - A1	10.36636	47.26	50	0.9999
PHA - A1	-54.2955	47.26	50	0.8583
A2PHA - A1PHA	63.39182	47.26	50	0.7607
MEIO - A1PHA	160.9018	47.26	50	0.0157
PHA - A1PHA	96.24	47.26	50	0.3371
A2PHA - A2	-84.32	47.26	50	0.4849
MEIO - A2	13.19	47.26	50	0.9998
PHA - A2	-51.4718	47.26	50	0.8834
MEIO - A2PHA	97.51	47.26	50	0.3228
PHA - A2PHA	32.84818	47.26	50	0.9817
PHA - MEIO	-64.6618	47.26	50	0.7454

## 3) Controle IL1-B

Anova-modelo misto				
FV	Df	SQ	F	p
Tratamento	5	48	40.47687	<.0001
Tukey				
Contraste	Estimativa	Erro Padrao	GL	valor p
A1PHA - A1	-5881.16	747.57	48	<.0001
A2 - A1	-450.186	747.57	48	0.9904
MEIO - A1	-516.689	769.38	48	0.9843
PHA - A1	-7976.24	769.38	48	<.0001
A2PHA - A1PHA	470.5836	747.57	48	0.9882
MEIO - A1PHA	5364.467	769.38	48	<.0001
PHA - A1PHA	-2095.09	769.38	48	0.0891
A2PHA - A2	-4960.39	747.57	48	<.0001
MEIO - A2	-66.5026	769.38	48	1
PHA - A2	-7526.06	769.38	48	<.0001
MEIO - A2PHA	4893.884	769.38	48	<.0001
PHA - A2PHA	-2565.67	769.38	48	0.0194
PHA - MEIO	-7459.55	791.36	48	<.0001

## 4) SCZ IL1-B

Anova-modelo misto				
FV	Df	SQ	F	p
Tratamento	5	50	16.35023	<.0001
Tukey				
Contraste	Estimativa	Erro Padrao	GL	valor p
A1PHA - A1	-5431.31	991.98	50	<.0001
A2 - A1	-1106.25	991.98	50	0.8728
MEIO - A1	-1626.49	991.98	50	0.577
PHA - A1	-5973.85	991.98	50	<.0001
A2PHA - A1PHA	-1053.07	991.98	50	0.8941
MEIO - A1PHA	3804.819	991.98	50	0.0045
PHA - A1PHA	-542.544	991.98	50	0.9938
A2PHA - A2	-5378.12	991.98	50	<.0001
MEIO - A2	-520.236	991.98	50	0.9949
PHA - A2	-4867.6	991.98	50	0.0001
MEIO - A2PHA	4857.889	991.98	50	0.0001
PHA - A2PHA	510.5264	991.98	50	0.9954
PHA - MEIO	-4347.36	991.98	50	0.0008

## 5) Controle MCP1

Anova-modelo misto				
FV	Df	SQ	F	p
Tratamento	5	48	0.61856	0.6862

## 6) SCZ MCP1

Anova-modelo misto				
FV	Df	SQ	F	p
Tratamento	5	50	5.47173	0.0004
Tukey				
Contraste	Estimativa	Erro Padrao	GL	valor p
A1PHA - A1	1615.009	505.11	50	0.0275
A2 - A1	168.8395	505.11	50	0.9994
MEIO - A1	1354.363	505.11	50	0.0972
PHA - A1	1864.553	505.11	50	0.0069
A2PHA - A1PHA	196.4945	505.11	50	0.9988
MEIO - A1PHA	-260.646	505.11	50	0.9953
PHA - A1PHA	249.5436	505.11	50	0.9962
A2PHA - A2	1642.664	505.11	50	0.0237
MEIO - A2	1185.524	505.11	50	0.1951
PHA - A2	1695.713	505.11	50	0.0179
MEIO - A2PHA	-457.14	505.11	50	0.9434
PHA - A2PHA	53.04909	505.11	50	1
PHA - MEIO	510.1893	505.11	50	0.9124

## 7) Controle IL6

Anova-modelo misto				
FV	Df	SQ	F	p
Tratamento	5	48	2.72	0.0303

## 8) SCZ IL6

Anova-modelo misto				
FV	Df	SQ	F	p
Tratamento	5	48	0.55865	0.7311

## 9) Controle IL10

Anova-modelo misto				
FV	Df	SQ	F	p
Tratamento	5	48	1.0169	0.4182

## 10) SCZ IL10

Anova-modelo misto				
FV	Df	SQ	F	p
Tratamento	5	50	1.19132	0.3269

## 11) Controle TNF-

Anova-modelo misto				
FV	Df	SQ	F	p
Tratamento	5	48	4.03355	0.0039
Tukey				
Contraste	Estimativa	Erro Padrao	GL	valor p
A1PHA - A1	-334.944	110.22	48	0.0419
A2 - A1	9.568545	110.22	48	1
MEIO - A1	-165.341	113.19	48	0.6902
PHA - A1	-357.356	113.19	48	0.031
A2PHA - A1PHA	113.3043	110.22	48	0.9062
MEIO - A1PHA	169.6026	113.19	48	0.6669
PHA - A1PHA	-22.4126	113.19	48	1
A2PHA - A2	-231.208	110.22	48	0.3058
MEIO - A2	-174.91	113.19	48	0.6374
PHA - A2	-366.925	113.19	48	0.0248
MEIO - A2PHA	56.29835	113.19	48	0.996
PHA - A2PHA	-135.717	113.19	48	0.8351
PHA - MEIO	-192.015	116.14	48	0.5684

## 12) SCZ TNF-

Anova-modelo misto				
FV	Df	SQ	F	p
Tratamento	5	50	3.292639	0.012
Tukey				
Contraste	Estimativa	Erro Padrao	GL	valor p
A1PHA - A1	-170.673	84.127	50	0.3412
A2 - A1	-89.7505	84.127	50	0.8921
MEIO - A1	-146.929	84.127	50	0.5086
PHA - A1	-322.636	84.127	50	0.0045
A2PHA - A1PHA	-23.9208	84.127	50	0.9997
MEIO - A1PHA	23.74382	84.127	50	0.9997
PHA - A1PHA	-151.963	84.127	50	0.4711
A2PHA - A2	-104.843	84.127	50	0.8119
MEIO - A2	-57.1783	84.127	50	0.9834
PHA - A2	-232.885	84.127	50	0.0797
MEIO - A2PHA	47.66464	84.127	50	0.9927

PHA - A2PHA	-128.042	84.127	50	0.652
PHA - MEIO	-175.707	84.127	50	0.3098

## 13) Controle IL-17 FARMACO B (LY) DAQUI PARA FRENTE

Anova-modelo misto				
FV	Df	SQ	F	p
Tratamento	5	47	1.663898	0.1619

## 14) SCZ IL-17

Anova-modelo misto				
FV	Df	SQ	F	p
Tratamento	5	48	3.330699	0.0116

## 15) Controle IL1-B

Anova-modelo misto				
FV	Df	SQ	F	p
Tratamento	5	47	14.44733	<.0001
Tukey				
Contraste	Estimativa	Erro Padrao	GL	valor p
B1PHA - B1	-4293.82	1258.4	47	<b>0.0158</b>
B2 - B1	1814.923	1291.9	47	0.7239
MEIO - B1	5017.142	1291.9	47	<b>0.0041</b>
PHA - B1	-2457.53	1291.9	47	0.4136
B2PHA - B1PHA	1175.948	1258.4	47	0.9355
MEIO - B1PHA	9310.958	1291.9	47	<b>&lt;.0001</b>
PHA - B1PHA	1836.287	1291.9	47	0.7141
B2PHA - B2	-4932.79	1291.9	47	<b>0.005</b>
MEIO - B2	3202.219	1325.1	47	0.1715
PHA - B2	-4272.45	1325.1	47	<b>0.0262</b>
MEIO - B2PHA	8135.01	1291.9	47	<b>&lt;.0001</b>
PHA - B2PHA	660.3386	1291.9	47	0.9955
PHA - MEIO	-7474.67	1325.1	47	<b>&lt;.0001</b>

## 16) SCZ IL1-B

Anova-modelo misto				
FV	Df	SQ	F	p
Tratamento	5	47	12.904	<.0001
Tukey				
Contraste	Estimativa	Erro Padrao	GL	valor p
B1PHA - B1	-2064.82	1308.7	48	0.6168
B2 - B1	3425.736	1308.7	48	0.1126
MEIO - B1	6049.502	1274.7	48	<b>0.0003</b>
PHA - B1	1702.139	1274.7	48	0.7641
B2PHA - B1PHA	-362.884	1308.7	48	0.9998
MEIO - B1PHA	8114.326	1308.7	48	<b>&lt;.0001</b>
PHA - B1PHA	3766.963	1308.7	48	0.0621
B2PHA - B2	-5853.44	1308.7	48	0.0006
MEIO - B2	2623.766	1308.7	48	0.3548
PHA - B2	-1723.6	1308.7	48	0.7743
MEIO - B2PHA	8477.21	1274.7	48	<b>&lt;.0001</b>
PHA - B2PHA	4129.847	1274.7	48	<b>0.025</b>
PHA - MEIO	-4347.36	1274.7	48	0.0157

## 17) Controle MCP1

Anova-modelo misto				
FV	Df	SQ	F	p
Tratamento	5	48	9.03118	<.0001
Tukey				
Contraste	Estimativa	Erro Padrao	GL	valor p
B1PHA - B1	75.17527	396.5375	48	1
B2 - B1	-352.449	396.5375	48	0.9474
B2PHA - B1	-158.15755	396.5375	48	0.9986
MEIO - B1	-1957.6935	406.8791	48	<b>0.0002</b>
PHA - B1	-1547.5071	406.8791	48	0.0051
B2 - B1PHA	-427.62427	396.5375	48	0.8875
B2PHA - B1PHA	-233.33282	396.5375	48	0.9913
MEIO - B1PHA	-2032.8688	406.8791	48	<b>0.0001</b>
PHA - B1PHA	-1622.6824	406.8791	48	<b>0.0029</b>
B2PHA - B2	194.29145	396.5375	48	0.9963
MEIO - B2	-1605.2445	406.8791	48	<b>0.0033</b>
PHA - B2	-1195.0581	406.8791	48	0.0539
MEIO - B2PHA	-1799.536	406.8791	48	<b>0.0008</b>
PHA - B2PHA	-1389.3496	406.8791	48	<b>0.0156</b>
PHA - MEIO	410.18641	417.0774	48	0.921

## 18) SCZ MCP1

Anova-modelo misto				
FV	Df	SQ	F	p
Tratamento	5	49	9.461686	<.0001
Tukey				
Contraste	Estimativa	Erro Padrao	GL	valor p
B1PHA - B1	-21.82755	371.1374	48	1
B2 - B1	-457.51603	381.3872	48	0.8349
B2PHA - B1	-267.60418	371.1374	48	0.9784
MEIO - B1	-1939.6993	371.1374	48	<b>0.0001</b>
PHA - B1	-1429.51	371.1374	48	0.0044
B2 - B1PHA	-435.68848	381.3872	48	0.8611
B2PHA - B1PHA	-245.77664	371.1374	48	0.9852
MEIO - B1PHA	-1917.8717	371.1374	48	<b>0.0001</b>
PHA - B1PHA	-1407.6825	371.1374	48	<b>0.0052</b>
B2PHA - B2	189.91185	381.3872	48	0.996
MEIO - B2	-1482.1833	381.3872	48	<b>0.0039</b>
PHA - B2	-971.99397	381.3872	48	0.1302
MEIO - B2PHA	-1672.0951	371.1374	48	<b>0.0006</b>
PHA - B2PHA	-1161.9058	371.1374	48	<b>0.0329</b>
PHA - MEIO	510.18927	371.1374	48	0.7416

## 19) Controle IL-6

Anova-modelo misto				
FV	Df	SQ	F	p
Tratamento	5	48	0.84019	0.5279

## 20) SCZ IL-6

Anova-modelo misto				
FV	Df	SQ	F	p
Tratamento	5	49	3.49218	0.0089
Tukey				
Contraste	Estimativa	Erro Padrao	GL	valor p
B1PHA - B1	212.59882	59.59199	49	0.01
B2 - B1	53.08554	61.32127	49	0.9528
B2PHA - B1	177.40273	59.59199	49	0.0486
MEIO - B1	101.26336	59.59199	49	0.5388
PHA - B1	142.24682	59.59199	49	0.1809
B2 - B1PHA	-159.51328	61.32127	49	0.1163
B2PHA - B1PHA	-35.19609	59.59199	49	0.9912
MEIO - B1PHA	-111.33545	59.59199	49	0.4334
PHA - B1PHA	-70.352	59.59199	49	0.8439
B2PHA - B2	124.31718	61.32127	49	0.3423

MEIO - B2	48.17782	61.32127	49	0.9687
PHA - B2	89.16128	61.32127	49	0.6943
MEIO - B2PHA	-76.13936	59.59199	49	0.7955
PHA - B2PHA	-35.15591	59.59199	49	0.9913
PHA - MEIO	40.98345	59.59199	49	0.9825

## 21) Controle IL-10

Anova-modelo misto					
	FV	Df	SQ	F	p
Tratamento		5	48	1.249515	0.3011

## 22) SCZ IL-10

Anova-modelo misto					
	FV	Df	SQ	F	p
Tratamento		5	49	1.849118	0.1207

## 23) Controle TNF-

Anova-modelo misto					
	FV	Df	SQ	F	p
Tratamento		5	48	4.25764	0.0028
Tukey					
Contraste	Estimativa	Erro Padrao	GL	valor p	
B1PHA - B1	-63.449455	99.6919	48	0.9876	
B2 - B1	-7.282182	99.6919	48	1	
B2PHA - B1	-122.42236	99.6919	48	0.821	
MEIO - B1	-208.29347	102.1538	48	0.3363	
PHA - B1	-394.92617	102.1538	48	0.0042	
B2 - B1PHA	56.167273	99.6919	48	0.9929	
B2PHA - B1PHA	-58.972909	99.6919	48	0.9911	
MEIO - B1PHA	-144.84402	102.1538	48	0.7162	
PHA - B1PHA	-331.47672	102.1538	48	<b>0.0246</b>	
B2PHA - B2	-115.14018	99.6919	48	0.8555	
MEIO - B2	-201.01129	102.1538	48	0.3755	
PHA - B2	-387.64399	102.1538	48	0.0052	
MEIO - B2PHA	-85.871109	102.1538	48	0.9583	
PHA - B2PHA	-272.50381	102.1538	48	0.1009	
PHA - MEIO	-186.6327	104.5577	48	0.4848	

## 24) SCZ TNF-

Anova-modelo misto				
FV	Df	SQ	F	p
Tratamento	5	49	2.964699	0.0204
Tukey				
Contraste	Estimativa	Erro Padrao	GL	valor p
B1PHA - B1	18.010364	86.65517	49	0.9999
B2 - B1	-17.610767	89.1322	49	1
B2PHA - B1	-92.217455	86.65517	49	0.893
MEIO - B1	-93.72	86.65517	49	0.8864
PHA - B1	-269.42709	86.65517	49	0.0348
B2 - B1PHA	-35.621131	89.1322	49	0.9986
B2PHA - B1PHA	-110.22782	86.65517	49	0.7985
MEIO - B1PHA	-111.73036	86.65517	49	0.7893
PHA - B1PHA	-287.43746	86.65517	49	<b>0.0201</b>
B2PHA - B2	-74.606687	89.1322	49	0.959
MEIO - B2	-76.109233	89.1322	49	0.9555
PHA - B2	-251.81632	89.1322	49	0.0701
MEIO - B2PHA	-1.502545	86.65517	49	1
PHA - B2PHA	-177.20964	86.65517	49	0.3328
PHA - MEIO	-175.70709	86.65517	49	0.3421

## 25) Controle IL-17

Anova-modelo misto				
FV	Df	SQ	F	p
Tratamento	5	47	1.725647	0.1472

## 26) SCZ IL-17

Anova-modelo misto				
FV	Df	SQ	F	p
Tratamento	5	50	4.631031	0.0015
Tukey				
Contraste	Estimativa	Erro Padrao	GL	valor p
C1PHA - C1	-81.384545	26.72385	50	0.0407
C2 - C1	-1.766364	26.72385	50	1
C2PHA - C1	-72.764545	26.72385	50	0.0885
MEIO - C1	9.176364	26.72385	50	0.9993
PHA - C1	-55.485455	26.72385	50	0.3161
C2 - C1PHA	79.618182	26.72385	50	0.048
C2PHA - C1PHA	8.62	26.72385	50	0.9995
MEIO - C1PHA	90.560909	26.72385	50	<b>0.0164</b>

PHA - C1PHA	25.899091	26.72385	50	0.9255
C2PHA - C2	-70.998182	26.72385	50	0.1026
MEIO - C2	10.942727	26.72385	50	0.9984
PHA - C2	-53.719091	26.72385	50	0.3513
MEIO - C2PHA	81.940909	26.72385	50	<b>0.0386</b>
PHA - C2PHA	17.279091	26.72385	50	0.9867
PHA - MEIO	-64.661818	26.72385	50	0.1692

## 27) Controle IL1-B

Anova Modelo Misto				
FV	Df	SQ	F	p
Tratamento	5	47	54.88659	<.0001
Tukey				
Contraste	Estimativa	Erro Padrao	GL	valor p
C1PHA - C1	-7400.5	809.4396	47	<.0001
C2 - C1	1038.248	809.4396	47	0.7928
C2PHA - C1	-6447.03	809.4396	47	<.0001
MEIO - C1	2321.774	832.3752	47	0.077
PHA - C1	-5231.199	832.3752	47	<.0001
C2 - C1PHA	8438.748	786.6343	47	<.0001
C2PHA - C1PHA	953.47	786.6343	47	0.8288
MEIO - C1PHA	9722.273	809.4396	47	<b>&lt;.0001</b>
PHA - C1PHA	2169.301	809.4396	47	0.0986
C2PHA - C2	-7485.278	786.6343	47	<.0001
MEIO - C2	1283.525	809.4396	47	0.6118
PHA - C2	-6269.448	809.4396	47	<.0001
MEIO - C2PHA	8768.803	809.4396	47	<b>&lt;.0001</b>
PHA - C2PHA	1215.831	809.4396	47	0.6646
PHA - MEIO	-7552.973	832.3752	47	<b>&lt;.0001</b>

## 28) SCZ IL1-B

Anova-modelo misto				
FV	Df	SQ	F	p
Tratamento	5	50	13.55549	<.0001
Tukey				
Contraste	Estimativa	Erro Padrao	GL	valor p
C1PHA - C1	-5793.2591	1278.205	50	0.0005
C2 - C1	471.0573	1278.205	50	0.9991
C2PHA - C1	-5467.2191	1278.205	50	0.0011
MEIO - C1	2393.5045	1278.205	50	0.4306
PHA - C1	-1953.8582	1278.205	50	0.6479
C2 - C1PHA	6264.3164	1278.205	50	0.0001
C2PHA - C1PHA	326.04	1278.205	50	0.9998
MEIO - C1PHA	8186.7636	1278.205	50	<b>&lt;.0001</b>

PHA - C1PHA	3839.4009	1278.205	50	<b>0.0452</b>
C2PHA - C2	-5938.2764	1278.205	50	0.0003
MEIO - C2	1922.4473	1278.205	50	0.6633
PHA - C2	-2424.9155	1278.205	50	0.4159
MEIO - C2PHA	7860.7236	1278.205	50	<b>&lt;.0001</b>
PHA - C2PHA	3513.3609	1278.205	50	0.0834
PHA - MEIO	-4347.3627	1278.205	50	0.0158

## 29) Controle MCP1

Anova-modelo misto				
FV	Df	SQ	F	p
Tratamento	5	48	3.103685	0.0166
Tukey				
Contraste	Estimativa	Erro Padrao	GL	valor p
C1PHA - C1	-2.402455	424.8893	48	1
C2 - C1	-363.34309	424.8893	48	0.9552
C2PHA - C1	-207.23755	424.8893	48	0.9964
MEIO - C1	-1263.3826	437.0542	48	0.0603
PHA - C1	-1063.9908	437.0542	48	0.1651
C2 - C1PHA	-360.94064	424.8893	48	0.9564
C2PHA - C1PHA	-204.83509	424.8893	48	0.9966
MEIO - C1PHA	-1260.9802	437.0542	48	0.0611
PHA - C1PHA	-1061.5883	437.0542	48	0.1669
C2PHA - C2	156.10555	424.8893	48	0.9991
MEIO - C2	-900.03955	437.0542	48	0.3255
PHA - C2	-700.64767	437.0542	48	0.6006
MEIO - C2PHA	-1056.1451	437.0542	48	0.1711
PHA - C2PHA	-856.75321	437.0542	48	0.3797
PHA - MEIO	199.39188	449.2661	48	0.9977

## 30) SCZ MCP1

Anova-modelo misto				
FV	Df	SQ	F	p
Tratamento	5	50	3.043364	0.0178
Tukey				
Contraste	Estimativa	Erro Padrao	GL	valor p
C1PHA - C1	367.3232	374.0183	50	0.9215
C2 - C1	-126.0351	374.0183	50	0.9994
C2PHA - C1	225.8724	374.0183	50	0.9903
MEIO - C1	-906.5438	374.0183	50	0.1678
PHA - C1	-396.3545	374.0183	50	0.8948
C2 - C1PHA	-493.3583	374.0183	50	0.7732

C2PHA - C1PHA	-141.4508	374.0183	50	0.9989
MEIO - C1PHA	-1273.867	374.0183	50	<b>0.0156</b>
PHA - C1PHA	-763.6777	374.0183	50	0.3342
C2PHA - C2	351.9075	374.0183	50	0.9338
MEIO - C2	-780.5087	374.0183	50	0.3107
PHA - C2	-270.3195	374.0183	50	0.9782
MEIO - C2PHA	-1132.4162	374.0183	50	<b>0.0426</b>
PHA - C2PHA	-622.2269	374.0183	50	0.5616
PHA - MEIO	510.1893	374.0183	50	0.7478

## 31) Controle IL-6

Anova-modelo misto				
FV	Df	SQ	F	p
Tratamento	5	48	1.08131	0.3827

## 32) SCZ IL-6

Anova-modelo misto				
FV	Df	SQ	F	p
Tratamento	5	50	0.51676	0.7623

## 33) Controle IL-10

Anova-modelo misto				
FV	Df	SQ	F	p
Tratamento	5	48	0.896999	0.4908

## 34) SCZ IL-10

Anova-modelo misto				
FV	Df	SQ	F	p
Tratamento	5	50	1.038911	0.4053

## 35) Controle TNF-

Anova-modelo misto				
FV	Df	SQ	F	p
Tratamento	5	48	3.05561	0.0179
Tukey				
Contraste	Estimativa	Erro Padrao	GL	valor p
C1PHA - C1	-221.44427	104.7906	48	0.298
C2 - C1	0.7616364	104.7906	48	1
C2PHA - C1	-178.40018	104.7906	48	0.537
MEIO - C1	-149.18228	107.5667	48	0.7345
PHA - C1	-340.84718	107.5667	48	0.0301
C2 - C1PHA	222.20591	104.7906	48	0.2944

C2PHA - C1PHA	43.044091	104.7906	48	0.9984
MEIO - C1PHA	72.261991	107.5667	48	0.9842
PHA - C1PHA	-119.4029	107.5667	48	0.8748
C2PHA - C2	-179.16182	104.7906	48	0.5323
MEIO - C2	-149.94392	107.5667	48	0.7304
PHA - C2	-341.60881	107.5667	48	0.0295
MEIO - C2PHA	29.2179	107.5667	48	0.9998
PHA - C2PHA	-162.447	107.5667	48	0.6595
PHA - MEIO	-191.6649	110.3123	48	0.5147

## 36) SCZ TNF-

Anova-modelo misto				
FV	Df	SQ	F	p
Tratamento	5	50	1.298933	0.2794

## 37) Controle IL-17

Anova-modelo misto				
FV	Df	SQ	F	p
Tratamento	5	48	3.027746	0.0187
Tukey				
Contraste	Estimativa	Erro Padrao	GL	valor p
D1PHA - D1	-51.137273	21.97166	48	0.2034
D2 - D1	-12.846364	21.97166	48	0.9916
D2PHA - D1	-49.937273	21.97166	48	0.2252
MEIO - D1	16.146676	22.61362	48	0.9793
PHA - D1	-5.4143	22.61362	48	0.9999
D2 - D1PHA	38.290909	21.97166	48	0.5113
D2PHA - D1PHA	1.2	21.97166	48	1
MEIO - D1PHA	67.283949	22.61362	48	<b>0.0491</b>
PHA - D1PHA	45.722973	22.61362	48	0.3455
D2PHA - D2	-37.090909	21.97166	48	0.5461
MEIO - D2	28.99304	22.61362	48	0.7932
PHA - D2	7.432064	22.61362	48	0.9995
MEIO - D2PHA	66.083949	22.61362	48	0.0559
PHA - D2PHA	44.522973	22.61362	48	0.3748
PHA - MEIO	-21.560976	23.26068	48	0.9376

## 38) SCZ IL-17

Anova-modelo misto				
FV	Df	SQ	F	p
Tratamento	5	49	4.110729	0.0034
Tukey				
Contraste	Estimativa	Erro Padrao	GL	valor p

D1PHA - D1	-72.331818	28.49488	49	0.133
D2 - D1	12.148182	28.49488	49	0.9981
D2PHA - D1	-64.94863	29.31899	49	0.2495
MEIO - D1	24.851818	28.49488	49	0.9514
PHA - D1	-39.81	28.49488	49	0.7285
D2 - D1PHA	84.48	28.49488	49	0.0501
D2PHA - D1PHA	7.383189	29.31899	49	0.9999
MEIO - D1PHA	97.183636	28.49488	49	0.0156
PHA - D1PHA	32.521818	28.49488	49	0.8616
D2PHA - D2	-77.096811	29.31899	49	0.1093
MEIO - D2	12.703636	28.49488	49	0.9976
PHA - D2	-51.958182	28.49488	49	0.4607
MEIO - D2PHA	89.800448	29.31899	49	0.0392
PHA - D2PHA	25.13863	29.31899	49	0.9547
PHA - MEIO	-64.661818	28.49488	49	0.2263

## 39) Controle IL1-B

Anova-modelo misto				
FV	Df	SQ	F	p
Tratamento	5	48	70.47264	<.0001
Tukey				
Contraste	Estimativa	Erro Padrao	GL	valor p
D1PHA - D1	-8018.6336	764.347	48	<.0001
D2 - D1	78.87909	764.347	48	1
D2PHA - D1	-8693.7036	764.347	48	<.0001
MEIO - D1	1980.4461	786.5476	48	0.1392
PHA - D1	-5529.4351	786.5476	48	<.0001
D2 - D1PHA	8097.5127	764.347	48	<.0001
D2PHA - D1PHA	-675.07	764.347	48	0.9487
MEIO - D1PHA	9999.0797	786.5476	48	<.0001
PHA - D1PHA	2489.1985	786.5476	48	<b>0.0304</b>
D2PHA - D2	-8772.5827	764.347	48	<.0001
MEIO - D2	1901.567	786.5476	48	0.1707
PHA - D2	-5608.3142	786.5476	48	<.0001
MEIO - D2PHA	10674.15	786.5476	48	<.0001
PHA - D2PHA	3164.2685	786.5476	48	<b>0.0026</b>
PHA - MEIO	-7509.8812	808.898	48	<.0001

## 40) SCZ IL1-B

Anova-modelo misto				
FV	Df	SQ	F	p
Tratamento	5	49	13.04773	<.0001
Tukey				

Contraste	Estimativa	Erro Padrao	GL	valor p
D1PHA - D1	-5892.34	1370.104	49	0.0011
D2 - D1	373.4982	1370.104	49	0.9998
D2PHA - D1	-6081.1549	1408.107	49	0.001
MEIO - D1	2683.2673	1370.104	49	0.3805
PHA - D1	-1664.0955	1370.104	49	0.8277
D2 - D1PHA	6265.8382	1370.104	49	0.0004
D2PHA - D1PHA	-188.8149	1408.107	49	1
MEIO - D1PHA	8575.6073	1370.104	49	<b>&lt;.0001</b>
PHA - D1PHA	4228.2445	1370.104	49	<b>0.0369</b>
D2PHA - D2	-6454.6531	1408.107	49	0.0004
MEIO - D2	2309.7691	1370.104	49	0.5474
PHA - D2	-2037.5936	1370.104	49	0.6738
MEIO - D2PHA	8764.4222	1408.107	49	<b>&lt;.0001</b>
PHA - D2PHA	4417.0595	1408.107	49	<b>0.0324</b>
PHA - MEIO	-4347.3627	1370.104	49	<b>0.0295</b>

## 41) Controle MCP1

Anova-modelo misto				
FV	Df	SQ	F	p
Tratamento	5	48	5.5467	0.0004
Tukey				
Contraste	Estimativa	Erro Padrao	GL	valor p
D1PHA - D1	-155.48636	391.6942	48	0.9986
D2 - D1	96.96236	391.6942	48	0.9999
D2PHA - D1	-16.73227	391.6942	48	1
MEIO - D1	-1474.692	402.4401	48	<b>0.0077</b>
PHA - D1	-1126.1942	402.4401	48	0.075
D2 - D1PHA	252.44873	391.6942	48	0.9869
D2PHA - D1PHA	138.75409	391.6942	48	0.9992
MEIO - D1PHA	-1319.2056	402.4401	48	<b>0.0226</b>
PHA - D1PHA	-970.70779	402.4401	48	0.1726
D2PHA - D2	-113.69464	391.6942	48	0.9997
MEIO - D2	-1571.6544	402.4401	48	<b>0.0038</b>
PHA - D2	-1223.1565	402.4401	48	0.0419
MEIO - D2PHA	-1457.9597	402.4401	48	<b>0.0087</b>
PHA - D2PHA	-1109.4619	402.4401	48	0.0825
PHA - MEIO	348.49784	413.1384	48	0.9576

## 42) SCZ MCP1

Anova-modelo misto				
FV	Df	SQ	F	p
Tratamento	5	50	4.596335	0.0016
Tukey				

Contraste	Estimativa	Erro Padrao	GL	valor p
D1PHA - D1	272.42645	403.5023	50	0.9839
D2 - D1	87.54218	403.5023	50	0.9999
D2PHA - D1	221.23482	403.5023	50	0.9938
MEIO - D1	-1237.0743	403.5023	50	<b>0.0386</b>
PHA - D1	-726.885	403.5023	50	0.4741
D2 - D1PHA	-184.88427	403.5023	50	0.9973
D2PHA - D1PHA	-51.19164	403.5023	50	1
MEIO - D1PHA	-1509.5007	403.5023	50	<b>0.006</b>
PHA - D1PHA	-999.31145	403.5023	50	0.1508
D2PHA - D2	133.69264	403.5023	50	0.9994
MEIO - D2	-1324.6165	403.5023	50	<b>0.0219</b>
PHA - D2	-814.42718	403.5023	50	0.3468
MEIO - D2PHA	-1458.3091	403.5023	50	<b>0.0087</b>
PHA - D2PHA	-948.11982	403.5023	50	0.1941
PHA - MEIO	510.18927	403.5023	50	0.8025

## 43) Controle IL-6

Anova-modelo misto					
	FV	Df	SQ	F	p
Tratamento		5	48	1.78749	0.1333

## 44) SCZ IL-6

Anova-modelo misto					
	FV	Df	SQ	F	p
Tratamento		5	50	1.00602	0.424

## 45) Controle IL-10

Anova-modelo misto					
	FV	Df	SQ	F	p
Tratamento		5	48	2.587438	0.0376
Tukey					
Contraste	Estimativa	Erro Padrao	GL	valor p	
D1PHA - D1	194.95464	98.74016	48	0.3717	
D2 - D1	90.006	98.74016	48	0.9417	
D2PHA - D1	155.11136	98.74016	48	0.6211	
MEIO - D1	-125.76611	101.38504	48	0.8147	
PHA - D1	44.06231	101.38504	48	0.9979	
D2 - D1PHA	-104.94864	98.74016	48	0.8935	
D2PHA - D1PHA	-39.84327	98.74016	48	0.9985	
MEIO - D1PHA	-320.72075	101.38504	48	<b>0.0305</b>	
PHA - D1PHA	-150.89233	101.38504	48	0.6732	

D2PHA - D2	65.10536	98.74016	48	0.9855
MEIO - D2	-215.77211	101.38504	48	0.2906
PHA - D2	-45.94369	101.38504	48	0.9975
MEIO - D2PHA	-280.87748	101.38504	48	0.08
PHA - D2PHA	-111.04906	101.38504	48	0.8808
PHA - MEIO	169.82842	104.00629	48	0.5815

## 46) SCZ IL-10

Anova-modelo misto				
FV	Df	SQ	F	p
Tratamento	5	50	1.102797	0.3708

## 47) Controle TNF-

Anova-modelo misto				
FV	Df	SQ	F	p
Tratamento	5	48	3.82475	0.0054
Tukey				
Contraste	Estimativa	Erro Padrao	GL	valor p
D1PHA - D1	-288.63809	126.2976	48	0.22
D2 - D1	-60.38673	126.2976	48	0.9967
D2PHA - D1	-452.79855	126.2976	48	0.0096
MEIO - D1	-166.44103	129.5352	48	0.7917
PHA - D1	-357.57534	129.5352	48	0.0819
D2 - D1PHA	228.25136	126.2976	48	0.4709
D2PHA - D1PHA	-164.16045	126.2976	48	0.7837
MEIO - D1PHA	122.19706	129.5352	48	0.933
PHA - D1PHA	-68.93725	129.5352	48	0.9946
D2PHA - D2	-392.41182	126.2976	48	0.0353
MEIO - D2	-106.0543	129.5352	48	0.9626
PHA - D2	-297.18861	129.5352	48	0.2164
MEIO - D2PHA	286.35752	129.5352	48	0.252
PHA - D2PHA	95.22321	129.5352	48	0.9765
PHA - MEIO	-191.13431	132.7177	48	0.7027

## 48) SCZ TNF-

Anova-modelo misto				
FV	Df	SQ	F	p
Tratamento	5	50	0.85959	0.5148

Legenda: A = CHIR ; B= LY ; C= AS; D= Rapamicina; 1= Concentração 1 ;  
2 = Concentração 2.

APÊNDICE F – TESTES DE WILCOXON PARA AMOSTRAS PAREADAS EM CADA CONDIÇÃO  
EXPERIMENTAL

Representação Estatística Geral da Resposta Média entre Pacientes com Esquizofrenia e Controles saudáveis Frente a um Mesmo Estímulo.

Marcador	Amostra	p valor	Marcador	Amostra	p valor	Marcador	Amostra	p valor
IL-17	PLASMA	0.353	IL-1 $\beta$	PLASMA	0.447	TNF	PLASMA	0.641
IL-17	MEIO	1	IL-1 $\beta$	MEIO	0.102	TNF	MEIO	0.765
IL-17	PHA	0.477	IL-1 $\beta$	PHA	0.375	TNF	PHA	0.322
IL-17	CHIR[1]	1	IL-1 $\beta$	CHIR[1]	0.831	TNF	CHIR[1]	0.726
IL-17	CHIR[1]PHA	0.476	IL-1 $\beta$	CHIR[1]PHA	1	TNF	CHIR[1]PHA	0.24
IL-17	CHIR[2]	1	IL-1 $\beta$	CHIR[2]	0.52	TNF	CHIR[2]	0.126
IL-17	CHIR[2]PHA	0.765	IL-1 $\beta$	CHIR[2]PHA	0.52	TNF	CHIR[2]PHA	0.765
IL-17	LY[1]	0.683	<b>IL-1<math>\beta</math></b>	<b>LY[1]</b>	<b>0.032</b>	TNF	LY[1]	0.24
IL-17	LY[1]PHA	1	IL-1 $\beta$	LY[1]PHA	0.77	TNF	LY[1]PHA	0.765
IL-17	LY[2]	0.353	IL-1 $\beta$	LY[2]	0.359	TNF	LY[2]	0.236
IL-17	LY[2]PHA	0.541	IL-1 $\beta$	LY[2]PHA	0.175	TNF	LY[2]PHA	0.7
IL-17	AS[1]	0.636	IL-1 $\beta$	AS[1]	0.131	TNF	AS[1]	<b>0.032</b>
IL-17	AS[1]PHA	0.76	IL-1 $\beta$	AS[1]PHA	0.52	TNF	AS[1]PHA	0.413
IL-17	AS[2]	0.308	IL-1 $\beta$	AS[2]	0.123	TNF	AS[2]	0.185
IL-17	AS[2]PHA	0.722	IL-1 $\beta$	AS[2]PHA	0.275	TNF	AS[2]PHA	0.625
IL-17	Rapa[1]	0.813	IL-1 $\beta$	Rapa[1]	0.206	TNF	Rapa[1]	0.059
IL-17	Rap[1]PHA	0.541	IL-1 $\beta$	Rap[1]PHA	0.898	TNF	Rap[1]PHA	0.52
IL-17	Rapa[2]	0.683	IL-1 $\beta$	Rapa[2]	0.102	TNF	Rapa[2]	0.476
IL-17	Rap[1]PHA	0.846	IL-1 $\beta$	Rap[1]PHA	0.695	TNF	Rap[1]PHA	0.206
Marcador	Amostra	p valor	Marcador	Amostra	p valor	Marcador	Amostra	p valor
IL-6	PLASMA	0.59	IL-10	PLASMA	0.447	<b>MCP1</b>	<b>PLASMA</b>	<b>0.078</b>
IL-6	MEIO	0.32	<b>IL-10</b>	<b>MEIO</b>	<b>0.014</b>	MCP1	MEIO	1
IL-6	PHA	0.343	IL-10	PHA	1	MCP1	PHA	0.275
IL-6	CHIR[1]	0.147	IL-10	CHIR[1]	0.966	MCP1	CHIR[1]	0.147
IL-6	CHIR[1]PHA	0.32	IL-10	CHIR[1]PHA	0.898	MCP1	CHIR[1]PHA	0.32
IL-6	CHIR[2]	0.278	IL-10	CHIR[2]	0.262	MCP1	CHIR[2]	0.52
IL-6	CHIR[2]PHA	0.765	IL-10	CHIR[2]PHA	0.465	MCP1	CHIR[2]PHA	0.102
IL-6	LY[1]	0.206	<b>IL-10</b>	<b>LY[1]</b>	<b>0.007</b>	MCP1	LY[1]	0.365
IL-6	LY[1]PHA	0.365	IL-10	LY[1]PHA	0.236	MCP1	LY[1]PHA	0.7
IL-6	LY[2]	0.375	IL-10	LY[2]	0.722	MCP1	LY[2]	1
IL-6	LY[2]PHA	0.831	IL-10	LY[2]PHA	0.175	MCP1	LY[2]PHA	1
IL-6	AS[1]	0.083	IL-10	AS[1]	1	MCP1	AS[1]	0.765
IL-6	AS[1]PHA	0.966	IL-10	AS[1]PHA	0.32	MCP1	AS[1]PHA	0.831
IL-6	AS[2]	0.278	IL-10	AS[2]	0.465	MCP1	AS[2]	0.765
IL-6	AS[2]PHA	0.432	IL-10	AS[2]PHA	0.105	MCP1	AS[2]PHA	0.846
IL-6	Rapa[1]	0.206	IL-10	Rapa[1]	0.966	MCP1	Rapa[1]	1
IL-6	Rap[1]PHA	0.413	IL-10	Rap[1]PHA	0.193	MCP1	Rap[1]PHA	0.365
IL-6	Rapa[2]	0.206	IL-10	Rapa[2]	0.76	MCP1	Rapa[2]	0.476
IL-6	Rap[1]PHA	0.465	IL-10	Rap[1]PHA	0.359	MCP1	Rap[1]PHA	0.966

## 10 ANEXOS

### ANEXO A – INICIATIVA STROBE: SUBSÍDIOS PARA O APRIMORAMENTO E APRESENTAÇÃO DE RESUMOS OBSERVACIONAIS EM EPIDEMIOLOGIA

**Tabela.** Itens essenciais que devem ser descritos em estudos observacionais, segundo a declaração Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE). 2007.

Item	Nº	Recomendação
Título e Resumo	1	Indique o desenho do estudo no título ou no resumo, com termo comumente utilizado Disponibilize no resumo um sumário informativo e equilibrado do que foi feito e do que foi encontrado
Introdução		
Contexto/Justificativa	2	Detalhe o referencial teórico e as razões para executar a pesquisa.
Objetivos	3	Descreva os objetivos específicos, incluindo quaisquer hipóteses pré-existentes.
Métodos		
Desenho do estudo	4	Apresente, no início do artigo, os elementos-chave relativos ao desenho do estudo.
Contexto ( <i>setting</i> )	5	Descreva o contexto, locais e datas relevantes, incluindo os períodos de recrutamento, exposição, acompanhamento ( <i>follow-up</i> ) e coleta de dados.
Participantes	6	Estudos de Coorte: Apresente os critérios de elegibilidade, fontes e métodos de seleção dos participantes. Descreva os métodos de acompanhamento. Estudos de Caso-Controlle: Apresente os critérios de elegibilidade, as fontes e o critério-diagnóstico para identificação dos casos e os métodos de seleção dos controles. Descreva a justificativa para a eleição dos casos e controles Estudo Seccional: Apresente os critérios de elegibilidade, as fontes e os métodos de seleção dos participantes. Estudos de Coorte: Para os estudos pareados, apresente os critérios de pareamento e o número de expostos e não expostos. Estudos de Caso-Controlle: Para os estudos pareados, apresente os critérios de pareamento e o número de controles para cada caso.
Variáveis	7	Defina claramente todos os desfechos, exposições, preditores, confundidores em potencial e modificadores de efeito. Quando necessário, apresente os critérios diagnósticos.
Fontes de dados/ Mensuração	8 <sup>a</sup>	Para cada variável de interesse, forneça a fonte dos dados e os detalhes dos métodos utilizados na avaliação (mensuração). Quando existir mais de um grupo, descreva a comparabilidade dos métodos de avaliação.
Viés	9	Especifique todas as medidas adotadas para evitar potenciais fontes de vies.
Tamanho do estudo	10	Explique como se determinou o tamanho amostral.
Variáveis quantitativas	11	Explique como foram tratadas as variáveis quantitativas na análise. Se aplicável, descreva as categorizações que foram adotadas e porque.
Métodos estatísticos	12	Descreva todos os métodos estatísticos, incluindo aqueles usados para controle de confundimento. Descreva todos os métodos utilizados para examinar subgrupos e interações. Explique como foram tratados os dados faltantes ("missing data") Estudos de Coorte: Se aplicável, explique como as perdas de acompanhamento foram tratadas. Estudos de Caso-Controlle: Se aplicável, explique como o pareamento dos casos e controles foi tratado. Estudos Seccionais: Se aplicável, descreva os métodos utilizados para considerar a estratégia de amostragem. Descreva qualquer análise de sensibilidade.
Resultados		
Participantes	13 <sup>a</sup>	Descreva o número de participantes em cada etapa do estudo (ex: número de participantes potencialmente elegíveis, examinados de acordo com critérios de elegibilidade, elegíveis de fato, incluídos no estudo, que terminaram o acompanhamento e efetivamente analisados) Descreva as razões para as perdas em cada etapa. Avalie a pertinência de apresentar um diagrama de fluxo
Dados descritivos	14 <sup>a</sup>	Descreva as características dos participantes (ex: demográficas, clínicas e sociais) e as informações sobre exposições e confundidores em potencial. Indique o número de participantes com dados faltantes para cada variável de interesse. Estudos de Coorte: Apresente o período de acompanhamento (ex: média e tempo total)

Continua

ANEXO A – INICIATIVA STROBE: SUBSÍDIOS PARA O APRIMORAMENTO E APRESENTAÇÃO  
DE RESUMOS OBSERVACIONAIS EM EPIDEMIOLOGIA

Tabela continuação

Item	Nº	Recomendação
Desfecho	15 <sup>a</sup>	Estudos de Coorte: Descreva o número de eventos-desfecho ou as medidas-resumo ao longo do tempo Estudos de Caso-Control: Descreva o número de indivíduos em cada categoria de exposição ou apresente medidas-resumo de exposição. Estudos Seccionais: Descreva o número de eventos-desfecho ou apresente as medidas-resumo.
Resultados principais	16	Descreva as estimativas não ajustadas e, se aplicável, as estimativas ajustadas por variáveis confundidoras, assim como sua precisão (ex: intervalos de confiança). Deixe claro quais foram os confundidores utilizados no ajuste e porque foram incluídos. Quando variáveis contínuas forem categorizadas, informe os pontos de corte utilizados. Se pertinente, considere transformar as estimativas de risco relativo em termos de risco absoluto, para um período de tempo relevante.
Outras análises	17	Descreva outras análises que tenham sido realizadas. Ex: análises de subgrupos, interação, sensibilidade.
Discussão		
Resultados principais	18	Resuma os principais achados relacionando-os aos objetivos do estudo.
Limitações	19	Apresente as limitações do estudo, levando em consideração fontes potenciais de viés ou imprecisão. Discuta a magnitude e direção de vieses em potencial.
Interpretação	20	Apresente uma interpretação cautelosa dos resultados, considerando os objetivos, as limitações, a multiplicidade das análises, os resultados de estudos semelhantes e outras evidências relevantes.
Generalização	21	Discuta a generalização (validade externa) dos resultados.
Outras Informações		
Financiamento	22	Especifique a fonte de financiamento do estudo e o papel dos financiadores. Se aplicável, apresente tais informações para o estudo original no qual o artigo é baseado.

<sup>a</sup> Descreva essas informações separadamente para casos e controles em Estudos de Caso-Control e para grupos de expostos e não expostos, em Estudos de Coorte ou Estudos Seccionais.

Fonte: Malta et al. Rev Saúde Pública 2010; 44(3): 563

## 11 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas, Abul K.; Lichtman, Andrew H.; Pillai, Shiv. *Imunologia celular e molecular*. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

Ader, R. (2000). On the development of psychoneuroimmunology. *Eur J Pharmacol*, 405(1-3), 167-176.

Ader, R., & Cohen, N. (1975). Behaviorally conditioned immunosuppression. *PsychosomMed*, 37(4), 333-340.

Alessi, D. R., James, S. R., Downes, C. P., Holmes, A. B., Gaffney, P. R., Reese, C. B., & Cohen, P. (1997). Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase  $\alpha$ . *Curr Biol*, 7(4), 261-269.

Almeida Filho N, Rouquayrol MZ. Introdução à epidemiologia. Rio de Janeiro: Medsi; 2002.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION (APA). Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders – DSM-5. 5<sup>th</sup>.ed.. *Washington: APA*, 2013.

Amorin, P. (2000). Mini International Neuropsychiatric Interview (MINI): validação de entrevista breve para diagnóstico de transtornos mentais. *Rev. Bras. Psiquiatr.* [online]. 22(3), p.106-115. ISSN 1516-4446.

Bajestan, S. N., Sabouri, A. H., Nakamura, M., Takashima, H., Keikhaee, M. R., Behdani, F., . . . Osame, M. (2006). Association of akt1 haplotype with the risk of schizophrenia in iranian population. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 141B(4), 383-386. doi:10.1002/ajmg.b.30291

Bale, T. L. (2015). Epigenetic and transgenerational reprogramming of brain development. *Nat Rev Neurosci*, 16(6), 332-344. doi:10.1038/nrn3818

(BD Bioscience, San Diego, CA, USA):

BD OptEIA™ Technical Data Sheet. Human TNF ELISA. Acesso em 08/04/2018.

Disponível em: <http://wwwbdbiosciences.com/ds/pm/tds/555212.pdf>

BD OptEIA™ Technical Data Sheet. Human IL-6 ELISA. Acesso em 08/04/2018.

Disponível em: <http://wwwbdbiosciences.com/ds/pm/tds/555220.pdf>

BD OptEIA™ Technical Data Sheet. Human IL-10 ELISA. Acesso em 08/04/2018.

Disponível em: <http://wwwbdbiosciences.com/ds/pm/tds/555157.pdf>

Benros, M. E., Pedersen, M. G., Rasmussen, H., Eaton, W. W., Nordentoft, M., & Mortensen, P. B. (2014). A nationwide study on the risk of autoimmune diseases in individuals with a personal or a family history of schizophrenia and related psychosis. *Am J Psychiatry*, 171(2), 218-226. doi:10.1176/appi.ajp.2013.13010086

Beurel, E., Grieco, S. F., & Jope, R. S. (2015). Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): regulation, actions, and diseases. *Pharmacol Ther*, 148, 114-131. doi:10.1016/j.pharmthera.2014.11.016

Bleuler E. (1908). The prognosis of dementia praecox: the group of schizophrenias (Die prognose der dementia praecox: schizophreniegruppe. *AllgemeineZeitschrift fur Psychiatrie*;65:436-64)

Bleuler E.(1950) Dementia praecox or the group of schizophrenias. Monograph series on schizophrenia. Vol 1.New York: International University Press.

Blokland, G. A. M., Meshulam-Gately, R. I., Touloupoulou, T., Del Re, E. C., Lam, M., DeLisi, L. E., . . . Consortium, G. (2017). Heritability of Neuropsychological Measures in Schizophrenia and Nonpsychiatric Populations: A Systematic Review and Meta-analysis. *Schizophr Bull*, 43(4), 788-800. doi:10.1093/schbul/sbw146

Byers, J. M. (1989). Rudolf Virchow--father of cellular pathology. *Am J ClinPathol*, 92(4 Suppl 1), S2-8.

Burgering, B. M., & Coffey, P. J. (1995). Protein kinase b (c-akt) in phosphatidylinositol-3-oh kinase signal transduction. *Nature*, 376(6541), 599-602.

doi:10.1038/376599a0

Capuzzi, E., Bartoli, F., Crocamo, C., Clerici, M., & Carrà, G. (2017). Acute variations of cytokine levels after antipsychotic treatment in drug-naïve subjects with a first-episode psychosis: A meta-analysis. *Neurosci Biobehav Rev*, 77, 122-128. doi:10.1016/j.neubiorev.2017.03.003

Chen, C. Y.; Lane, H. Y.; Lin, C. H (2016). Effects of Antipsychotics on Bone Mineral Density in Patients with Schizophrenia: Gender Differences. *Clin Psychopharmacol Neurosci*, v. 14, n. 3, p. 238-49. ISSN 1738-1088.

Costa, A. B. et al. (2015). Construction of a scale to assess the methodological quality of systematic reviews. *Cien Saude Colet*, v. 20, n. 8, p. 2441-52, ISSN 1678-4561.

Costa-Mattioli, M., & Monteggia, L. M. (2013). mTOR complexes in neurodevelopmental and neuropsychiatric disorders. *Nat Neurosci*, 16(11), 1537-1543. doi:10.1038/nn.3546

Couzin-Frankel, J. (2010). Inflammation bares a dark side. *Science*, 330(6011), 1621.

Cross, D. A., Alessi, D. R., Cohen, P., Andjelkovich, M., & Hemmings, B. A. (1995). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase b. *Nature*, 378(6559), 785-789. doi:10.1038/378785a0

da Silveira, V. T., Medeiros, D. C., Ropke, J., Guidine, P. A., Rezende, G. H., Moraes, M. F., . . . de Oliveira, A. C. (2017). Effects of early or late prenatal immune activation in mice on behavioral and neuroanatomical abnormalities relevant to schizophrenia in the adulthood. *Int J Dev Neurosci*, 58, 1-8. doi:10.1016/j.ijdevneu.2017.01.009

da Silveira, Vívian Thaise; Candelario-Jalil, Eduardo., de Oliveira, Antônio Carlos Pinheiro. *Chapter 2: Immune-neuropharmacology*. In: Immunopsychiatry - A

Clinician's Introduction to the Immune Basis of Mental Disorders. Antonio L. Teixeira and Moises E. Bauer. 1. ed. Oxford Medicine Online, 2019. ISBN: 9780190884468. <https://global.oup.com/academic/product/immunopsychiatry-9780190884468?cc=br&lang=en&#>

Elkis (2000). A evolução do conceito de A evolução do conceito de esquizofrenia neste século esquizofrenia neste século. *RevBrasPsiquiatr*; 22(Supl I):23-6; 2000

Emamian, E. S. (2012). AKT/GSK3 signaling pathway and schizophrenia. *Front Mol Neurosci*, 5, 33. doi:10.3389/fnmol.2012.00033

Fessel, w. J., & Hirata-Hibi, m. (1963). Abnormal leukocytes in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry*, 9, 601-613.

Fiorentino, D. F., Zlotnik, A., Mosmann, T. R., Howard, M., & O'Garra, A. (2016). Pillars Article: IL-10 Inhibits Cytokine Production by Activated Macrophages. *J Immunol*. 1991. 147: 3815-3822. *J Immunol*, 197(5), 1539-1546.

Fond, G., Hamdani, N., Kapczinski, F., Boukouaci, W., Drancourt, N., Dargel, A., . . . Leboyer, M. (2014). Effectiveness and tolerance of anti-inflammatory drugs' add-on therapy in major mental disorders: a systematic qualitative review. *Acta Psychiatr Scand*, 129(3), 163-179. doi:10.1111/acps.12211

Freyberg, Z., Ferrando, S. J., & Javitch, J. A. (2010). Roles of the Akt/GSK-3 and Wnt signaling pathways in schizophrenia and antipsychotic drug action. *Am J Psychiatry*, 167(4), 388-396. doi:10.1176/appi.ajp.2009.08121873

Franke, T. F., Yang, S. I., Chan, T. O., Datta, K., Kazlauskas, A., Morrison, D. K., . . . Tsichlis, P. N. (1995). The protein kinase encoded by the akt proto-oncogene is a target of the pdgf-activated phosphatidylinositol 3-kinase. *Cell*, 81(5), 727-736.

Gao, L., Li, Z., Chang, S., & Wang, J. (2014). Association of interleukin-10 polymorphisms with schizophrenia: a meta-analysis. *PLoS One*, 9(3), e90407. doi:10.1371/journal.pone.0090407

Gururajan, A., & van den Buuse, M. (2014). Is the mTOR-signalling cascade disrupted in Schizophrenia? *J Neurochem*, *129*(3), 377-387. doi:10.1111/jnc.12622

Hanger, D. P., Hughes, K., Woodgett, J. R., Brion, J. P., & Anderton, B. H. (1992). Glycogen synthase kinase-3 induces alzheimer's disease-like phosphorylation of tau: Generation of paired helical filament epitopes and neuronal localisation of the kinase. *Neurosci Lett*, *147*(1), 58-62.

Haro, J. M. et al. (2011). Cross-national clinical and functional remission rates: Worldwide Schizophrenia Outpatient Health Outcomes (W-SOHO) study. *Br J Psychiatry*, v. 199, n. 3, p. 194-201, ISSN 1472-1465.

Haroon, E., Raison, C. L., & Miller, A. H. (2012). Psychoneuroimmunology meets neuropsychopharmacology: translational implications of the impact of inflammation on behavior. *Neuropsychopharmacology*, *37*(1), 137-162. doi:10.1038/npp.2011.205

Hartling, L., Abou-Setta, A. M., Dursun, S., Mousavi, S. S., Pasichnyk, D., & Newton, A. S. (2012). Antipsychotics in adults with schizophrenia: comparative effectiveness of first-generation versus second-generation medications: a systematic review and meta-analysis. *Ann Intern Med*, *157*(7), 498-511. doi:10.7326/0003-4819-157-7-201210020-00525

Hoogland, I. C., Houbolt, C., van Westerlo, D. J., van Gool, W. A., & van de Beek, D. (2015). Systemic inflammation and microglial activation: systematic review of animal experiments. *J Neuroinflammation*, *12*, 114. doi:10.1186/s12974-015-0332-6

Howell, K. R., Floyd, K., & Law, A. J. (2017). PKB /AKT3 loss-of-function causes learning and memory deficits and deregulation of AKT/mTORC2 signaling: Relevance for schizophrenia. *PLoS One*, *12*(5), e0175993. doi:10.1371/journal.pone.0175993

Ikeda, M., Iwata, N., Suzuki, T., Kitajima, T., Yamanouchi, Y., Kinoshita, Y., . . . Ozaki, N. (2004). Association of akt1 with schizophrenia confirmed in a japanese population. *Biol Psychiatry*, *56*(9), 698-700. doi:10.1016/j.biopsych.2004.07.023

Jin, H., & Mosweu, I. (2017). The Societal Cost of Schizophrenia: A Systematic Review. *Pharmacoeconomics*, 35(1), 25-42. doi:10.1007/s40273-016-0444-6

Kraepelin E. (1919) Dementia praecox and paraphrenia. (From the German 8th Edition of the Textbook of Psychiatry ed.) Edinburgh: E & S Livingstone; 1919. p. 74-5

Kay, S. R., Fiszbein, A., & Opler, L. A. (1987). The positive and negative syndrome scale (PANSS) for schizophrenia. *Schizophr Bull*, 13(2), 261-276.

Keating, R., & McGargill, M. A. (2016).mTOR Regulation of Lymphoid Cells in Immunity to Pathogens. *Front Immunol*, 7, 180. doi:10.3389/fimmu.2016.00180

Kennedy, B. K., & Lamming, D. W. (2016). The Mechanistic Target of Rapamycin: The Grand Conductor of Metabolism and Aging. *Cell Metab*, 23(6), 990-1003. doi:10.1016/j.cmet.2016.05.009

Keverne, E. B. (2014). Significance of epigenetics for understanding brain development, brain evolution and behaviour. *Neuroscience*, 264, 207-217. doi:10.1016/j.neuroscience.2012.11.030

Khandaker, G. M., Zammit, S., Lewis, G., & Jones, P. B. (2014). A population-based study of atopic disorders and inflammatory markers in childhood before psychotic experiences in adolescence. *Schizophr Res*, 152(1), 139-145. doi:10.1016/j.schres.2013.09.021

Khandaker, G. M., Zimbron, J., Dalman, C., Lewis, G., & Jones, P. B. (2012). Childhood infection and adult schizophrenia: a meta-analysis of population-based studies. *Schizophr Res*, 139(1-3), 161-168. doi:10.1016/j.schres.2012.05.023

Khandaker, G. M., Zimbron, J., Lewis, G., & Jones, P. B. (2013). Prenatal maternal infection, neurodevelopment and adult schizophrenia: a systematic review of population-based studies. *Psychol Med*, 43(2), 239-257. doi:10.1017/S0033291712000736

Kim, S., Yeganova, L., & Wilbur, W. J. (2016). Meshable: searching PubMed abstracts by utilizing MeSH and MeSH-derived topical terms. *Bioinformatics*, 32(19), 3044-3046. doi:10.1093/bioinformatics/btw331

Klein, P. S., & Melton, D. A. (1996). A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(16), 8455-8459.

Kordi-Tamandani, D. M., & Mir, A. (2016). Relationship between phosphoinositide-3-kinase genetic polymorphism and schizophrenia. *Nord J Psychiatry*, 70(4), 272-275. doi:10.3109/08039488.2015.1092171

Kumarasinghe, N., Beveridge, N. J., Gardiner, E., Scott, R. J., Yasawardene, S., Perera, A., . . . Tooney, P. A. (2013). Gene expression profiling in treatment-naive schizophrenia patients identifies abnormalities in biological pathways involving AKT1 that are corrected by antipsychotic medication. *Int J Neuropsychopharmacol*, 16(7), 1483-1503. doi:10.1017/S1461145713000035

Lee, D. Y. (2015). Roles of mTOR Signaling in Brain Development. *ExpNeurobiol*, 24(3), 177-185. doi:10.5607/en.2015.24.3.177

Lee, K. Y., Joo, E. J., Jeong, S. H., Kang, U. G., Roh, M. S., Kim, S. H., . . . Kim, Y. S. (2010). No association between akt1 polymorphism and schizophrenia: A case-control study in a korean population and a meta-analysis. *Neurosci Res*, 66(3), 238-245. doi:10.1016/j.neures.2009.11.005

Leucht, S., Kane, J. M., Kissling, W., Hamann, J., Etschel, E., & Engel, R. R. (2005). What does the PANSS mean? *Schizophr Res*, 79(2-3), 231-238. doi:10.1016/j.schres.2005.04.008

Liberati, A. et al. The PRISMA statement for reporting systematic reviews and meta-analyses of studies that evaluate healthcare interventions: explanation and elaboration. **BMJ**, v. 339, p. b2700, Jul 2009. ISSN 1756-1833.

Lipton, J. O., & Sahin, M. (2014). The neurology of mTOR. *Neuron*, 84(2), 275-291.

doi:10.1016/j.neuron.2014.09.034

Liu, L., Luo, Y., Zhang, G., Jin, C., Zhou, Z., Cheng, Z., & Yuan, G. (2016). The mrna expression of drd2, pi3kcb, and akt1 in the blood of acute schizophrenia patients. *Psychiatry Res*, 243, 397-402. doi:10.1016/j.psychres.2016.07.010

Liu, Y. L., Fann, C. S., Liu, C. M., Wu, J. Y., Hung, S. I., Chan, H. Y., . . . Hwu, H. G. (2006). Absence of significant associations between four akt1 snp markers and schizophrenia in the taiwanese population. *Psychiatr Genet*, 16(1), 39-41.

Macêdo, D. S., Araújo, D. P., Sampaio, L. R., Vasconcelos, S. M., Sales, P. M., Sousa, F. C., . . . Carvalho, A. F. (2012). Animal models of prenatal immune challenge and their contribution to the study of schizophrenia: a systematic review. *Braz J Med Biol Res*, 45(3), 179-186.

Malta, M. et al.(2010).Iniciativa STROBE: subsídios para a comunicação de estudos observacionais.**Rev SaúdePública**; 44(3):559-65

Mandelkow, E. M., Drewes, G., Biernat, J., Gustke, N., Van Lint, J., Vandenheede, J. R., & Mandelkow, E. (1992). Glycogen synthase kinase-3 and the alzheimer-like state of microtubule-associated protein tau. *FEBS Lett*, 314(3), 315-321.

Matsuda, S., Ikeda, Y., Murakami, M., Nakagawa, Y., Tsuji, A., & Kitagishi, Y. (2019). Roles of pi3k/akt/gsk3 pathway involved in psychiatric illnesses. *Diseases*, 7(1). doi:10.3390/diseases7010022

MeSH terms- LY294002: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/?term=LY294002>

MeSH terms- AS605240: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/?term=AS605240>

MeSH terms- CHIR99021: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/?term=CHIR99021>

Michalska da Rocha, B., Rhodes, S., Vasilopoulou, E., & Hutton, P. (2018). Loneliness in Psychosis: A Meta-analytical Review. *Schizophr Bull*, 44(1), 114-125.

doi:10.1093/schbul/sbx036

Miller, A. H. (2009). Norman Cousins Lecture. Mechanisms of cytokine-induced behavioral changes: psychoneuroimmunology at the translational interface. *Brain Behav Immun*, 23(2), 149-158. doi:10.1016/j.bbi.2008.08.006

Miller, B. J., Buckley, P., Seabolt, W., Mellor, A., & Kirkpatrick, B. (2011). Meta-analysis of cytokine alterations in schizophrenia: clinical status and antipsychotic effects. *Biol Psychiatry*, 70(7), 663-671. doi:10.1016/j.biopsych.2011.04.013

aMiller, A. H., Haroon, E., Raison, C. L., & Felger, J. C. (2013). Cytokine targets in the brain: impact on neurotransmitters and neurocircuits. *Depress Anxiety*, 30(4), 297-306. doi:10.1002/da.22084

bMiller, B. J., Gassama, B., Sebastian, D., Buckley, P., & Mellor, A. (2013). Meta-analysis of lymphocytes in schizophrenia: clinical status and antipsychotic effects. *Biol Psychiatry*, 73(10), 993-999. doi:10.1016/j.biopsych.2012.09.007

Miller, A. H., Haroon, E., & Felger, J. C. (2017). Therapeutic Implications of Brain-Immune Interactions: Treatment in Translation. *Neuropsychopharmacology*, 42(1), 334-359. doi:10.1038/npp.2016.167

Minias, P., Gach, K., Włodarczyk, R., & Janiszewski, T. (2019). Colony size affects nestling immune function: a cross-fostering experiment in a colonial waterbird. *Oecologia*. doi:10.1007/s00442-019-04402-3

Monroe, J. M., Buckley, P. F., & Miller, B. J. (2015). Meta-Analysis of Anti-Toxoplasma gondii IgM Antibodies in Acute Psychosis. *Schizophr Bull*, 41(4), 989-998. doi:10.1093/schbul/sbu159

National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, E. a., and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). (2002). Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults

(Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation*, 106(25), 3143-3421.

Norton, N., Williams, H. J., Dwyer, S., Carroll, L., Peirce, T., Moskvina, V., . . . O'Donovan, M. C. (2007). Association analysis of akt1 and schizophrenia in a uk case control sample. *Schizophr Res*, 93(1-3), 58-65. doi:10.1016/j.schres.2007.02.006

OMS. Organização Mundial da Saúde: Relatório mundial da saúde mental: nova concepção, nova esperança. Lisboa: ClimepsEditores, 2002.

Oya, K., Kishi, T., & Iwata, N. (2014). Efficacy and tolerability of minocycline augmentation therapy in schizophrenia: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Hum Psychopharmacol*, 29(5), 483-491. doi:10.1002/hup.2426

Pae, C. U., Chung, K. I., Kim, J. J., Yu, H. S., Lee, C. U., Lee, S. J., . . . Paik, I. H. (2004). Monocyte chemoattractant protein-1 promoter -2518 polymorphism and schizophrenia in the korean population. *Psychiatr Genet*, 14(2), 65-67.

Pandey, G. N., Rizavi, H. S., Zhang, H., & Ren, X. (2018). Abnormal gene and protein expression of inflammatory cytokines in the postmortem brain of schizophrenia patients. *Schizophr Res*, 192, 247-254. doi:10.1016/j.schres.2017.04.043

Passos, I. C., Vasconcelos-Moreno, M. P., Costa, L. G., Kunz, M., Brietzke, E., Quevedo, J., . . . Kauer-Sant'Anna, M. (2015). Inflammatory markers in post-traumatic stress disorder: a systematic review, meta-analysis, and meta-regression. *Lancet Psychiatry*, 2(11), 1002-1012. doi:10.1016/S2215-0366(15)00309-0

Portada de etimologías – Último acesso em maio/2019: <http://etimologias.dechile.net/?interleucina> - In <http://www.dechile.net/>.

Portada de etimologías – Último acesso em maio/2019: <http://etimologias.dechile.net/?esquizofrenia>

Potvin, S., Stip, E., Sepehry, A. A., Gendron, A., Bah, R., & Kouassi, E. (2008). Inflammatory cytokine alterations in schizophrenia: a systematic quantitative review. *Biol Psychiatry*, *63*(8), 801-808. doi:10.1016/j.biopsych.2007.09.024

Qin, H., Zhang, L., Xu, G., & Pan, X. (2013). Lack of association between TNF rs1800629 polymorphism and schizophrenia risk: a meta-analysis. *Psychiatry Res*, *209*(3), 314-319. doi:10.1016/j.psychres.2013.01.019

Rodgers, A. B., Morgan, C. P., Leu, N. A., & Bale, T. L. (2015). Transgenerational epigenetic programming via sperm microRNA recapitulates effects of paternal stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *112*(44), 13699-13704. doi:10.1073/pnas.1508347112

Sadahiro, A., Diogo, C. L., Oshiro, T. M., & Shikanai-Yasuda, M. A. (2007). Kinetics of IFN-gamma, TNF-alpha, IL-10 and IL-4 production by mononuclear cells stimulated with gp43 peptides, in patients cured of paracoccidioidomycosis. *Rev Soc Bras Med Trop*, *40*(2), 156-162.

Sarbassov, D. D., Guertin, D. A., Ali, S. M., & Sabatini, D. M. (2005). Phosphorylation and regulation of akt/pkb by the rictor-mtor complex. *Science*, *307*(5712), 1098-1101. doi:10.1126/science.1106148

Science, Vol 330, issue 6011, page 1621, 2010. Table of Contents. Special Issue: Insights of the decade (2010, December). Inflammation Bares a Dark Side. Retrieved October 11, 2017, from do the web site: <http://science.sciencemag.org/content/330/6011>

Schneider K. Primary and secondary symptoms of schizophrenia (1957). In: Shepperd SHM, editor. Themes and variations on european psychiatry. Bristol: John Wright & Sons Ltd; 1974. p. 40-4

Schwab, S. G., Hoefgen, B., Hanes, C., Hassenbach, M. B., Albus, M., Lerer, B., . . . Wildenauer, D. B. (2005). Further evidence for association of variants in the akt1 gene with schizophrenia in a sample of european sib-pair families. *Biol Psychiatry*, *58*(6), 446-450. doi:10.1016/j.biopsych.2005.05.005

Seeman, M. V. (2004). Gender differences in the prescribing of antipsychotic drugs. *Am J Psychiatry*, 161(8), 1324-1333. doi:10.1176/appi.ajp.161.8.1324

aShea, B. J. et al.. Development of AMSTAR: a measurement tool to assess the methodological quality of systematic reviews. **BMC Med Res Methodol**, v. 7, p. 10, Feb 2007. ISSN 1471-2288.

bShea, B. J. et al. External validation of a measurement tool to assess systematic reviews (AMSTAR). **PLoS One**, v. 2, n. 12, p. e1350, Dec 2007. ISSN 1932-6203.

Silva V. et al.. *Overview* de revisões sistemáticas – um novo tipo de estudo. Parte I: Por que e para quem? Centro Cochrane do Brasil (CCB), Programa de Pós-graduação em Medicina Interna e Terapêutica (PgMIT) da Universidade Federal de São Paulo (Unifesp). **Diagn Tratamento**. 2012;17(4):195-200.

Silva V. et al.. *Overview* de revisões sistemáticas – um novo tipo de estudo. Parte II. Centro Cochrane do Brasil (CCB), Programa de Pós-graduação em Medicina Interna e Terapêutica (PgMIT) da Universidade Federal de São Paulo (Unifesp). **Diagn Tratamento**. 2014;19(1):29-41.

Stafford, M. R., Mayo-Wilson, E., Loucas, C. E., James, A., Hollis, C., Birchwood, M., & Kendall, T. (2015). Efficacy and safety of pharmacological and psychological interventions for the treatment of psychosis and schizophrenia in children, adolescents and young adults: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*, 10(2), e0117166. doi:10.1371/journal.pone.0117166

Stambolic, V., Ruel, L., & Woodgett, J. R. (1996). Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 activity and mimics wingless signalling in intact cells. *Curr Biol*, 6(12), 1664-1668.

Stephens, L., Anderson, K., Stokoe, D., Erdjument-Bromage, H., Painter, G. F., Holmes, A. B., . . . Hawkins, P. T. (1998). Protein kinase b kinases that mediate phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent activation of protein kinase b. *Science*, 279(5351), 710-714.

Stokoe, D., Stephens, L. R., Copeland, T., Gaffney, P. R., Reese, C. B., Painter, G. F., . . . Hawkins, P. T. (1997). Dual role of phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate in the activation of protein kinase b. *Science*, 277(5325), 567-570.

Stone, J. M., Raffin, M., Morrison, P., & McGuire, P. K. (2010). Review: The biological basis of antipsychotic response in schizophrenia. *J Psychopharmacol*, 24(7), 953-964. doi:10.1177/0269881109106959

Stuart, M. J., Singhal, G., & Baune, B. T. (2015). Systematic Review of the Neurobiological Relevance of Chemokines to Psychiatric Disorders. *Front Cell Neurosci*, 9, 357. doi:10.3389/fncel.2015.00357

Szkultecka-D bek, M., Miernik, K., Stelmachowski, J., Jakovljevi , M., Juki , V., Adamsoo, K., . . . Augusty ska, J. (2016). Schizophrenia causes significant burden to patients' and caregivers' lives. *PsychiatrDanub*, 28(2), 104-110.

Thiselton, D. L., Vladimirov, V. I., Kuo, P. H., McClay, J., Wormley, B., Fanous, A., . . . Riley, B. P. (2008). Akt1 is associated with schizophrenia across multiple symptom dimensions in the irish study of high density schizophrenia families. *Biol Psychiatry*, 63(5), 449-457. doi:10.1016/j.biopsych.2007.06.005

Tracy, R. P. (2006). The five cardinal signs of inflammation: Calor, Dolor, Rubor, Tumor ... and Penuria (Apologies to Aulus Cornelius Celsus, De medicina, c. A.D. 25). *J Gerontol A BiolSci Med Sci*, 61(10), 1051-1052.

Trancas, B., & Borja Santos, N. (2007). [Ethics, knowledge and psychiatry: in Aulus Cornelius Celsus' De Medicina]. *Acta Med Port*, 20(5), 431-437.

Upthegrove, R., Manzanares-Teson, N., & Barnes, N. M. (2014). Cytokine function in medication-naive first episode psychosis: a systematic review and meta-analysis. *Schizophr Res*, 155(1-3), 101-108. doi:10.1016/j.schres.2014.03.005

Walter, E., & Scott, M. (2017). The life and work of Rudolf Virchow 1821-1902: "Cell theory, thrombosis and the sausage duel". *J Intensive Care Soc*, 18(3), 234-235.

doi:10.1177/1751143716663967

Ustün, T. B. & Chisholm, D. (2001). Global "burden of disease"-study for psychiatric disorders. **PsychiatrPrax**, v. 28 Suppl1, p. S7-11, Jul 2001. ISSN 0303-4259.

van Beveren, N. J., Buitendijk, G. H., Swagemakers, S., Krab, L. C., Röder, C., de Haan, L., . . . Elgersma, Y. (2012). Marked reduction of AKT1 expression and deregulation of AKT1-associated pathways in peripheral blood mononuclear cells of schizophrenia patients. *PLoS One*, 7(2), e32618. doi:10.1371/journal.pone.0032618

Vanhaesebroeck, B., Stephens, L., & Hawkins, P. (2012). Pi3k signalling: The path to discovery and understanding. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13(3), 195-203. doi:10.1038/nrm3290

van Os, J., Kenis, G., & Rutten, B. P. (2010). The environment and schizophrenia. *Nature*, 468(7321), 203-212. doi:10.1038/nature09563

Vlahos, C. J., Matter, W. F., Hui, K. Y., & Brown, R. F. (1994). A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4h-1-benzopyran-4-one (ly294002). *J Biol Chem*, 269(7), 5241-5248.

Whitcomb, B. W., Mumford, S. L., Perkins, N. J., Wactawski-Wende, J., Bertone-Johnson, E. R., Lynch, K. E., & Schisterman, E. F. (2014). Urinary cytokine and chemokine profiles across the menstrual cycle in healthy reproductive-aged women. *Fertil Steril*, 101(5), 1383-1391. doi:10.1016/j.fertnstert.2014.01.027

Xiu, M. H., Tian, L., Chen, S., Tan, Y. L., Chen, D. C., Chen, J., . . . Zhang, X. Y. (2016). Contribution of il-10 and its -592 a/c polymorphism to cognitive functions in first-episode drug-naive schizophrenia. *Brain Behav Immun*, 57, 116-124. doi:10.1016/j.bbi.2016.03.005

Xu, D., Chen, G., Kong, L., Zhang, W., Hu, L., Chen, C., . . . Zhuo, C. (2017). Lower risk of liver cancer in patients with schizophrenia: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Oncotarget*, 8(60), 102328-102335.

doi:10.18632/oncotarget.21679

Xu, M. Q., Xing, Q. H., Zheng, Y. L., Li, S., Gao, J. J., He, G., . . . He, L. (2007). Association of akt1 gene polymorphisms with risk of schizophrenia and with response to antipsychotics in the chinese population. *J Clin Psychiatry*, *68*(9), 1358-1367.

Zhang, Q., Hong, W., Li, H., Peng, F., Wang, F., Li, N., . . . Zhao, M. (2017). Increased ratio of high sensitivity c-reactive protein to interleukin-10 as a potential peripheral biomarker of schizophrenia and aggression. *Int J Psychophysiol*, *114*, 9-15. doi:10.1016/j.ijpsycho.2017.02.001

Zhuo, C., Tao, R., Jiang, R., Lin, X., & Shao, M. (2017). Cancer mortality in patients with schizophrenia: systematic review and meta-analysis. *Br J Psychiatry*, *211*(1), 7-13. doi:10.1192/bjp.bp.116.195776

Zhuo, C., & Triplett, P. T. (2018). Association of Schizophrenia With the Risk of Breast Cancer Incidence: A Meta-analysis. *JAMA Psychiatry*, *75*(4), 363-369. doi:10.1001/jamapsychiatry.2017.4748