

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Clínica Médica

**Sistema Purinérgico em Esquizofrenia:
Determinação da Atividade das Enzimas 5' Nucleotidase e Adenosina
Deaminase em Soro de Pacientes Esquizofrênicos**

Miriam Garcia Brunstein

Orientador: Prof. Dr. Paulo Belmonte de Abreu

Dissertação de Mestrado

2001

MED
T
WM203 B899s 2001

05907564

[000596529] Brunstein, Miriam Garcia. Sistema purinérgico em esquizofrenia : determinação da atividade das enzimas 5' nucleotidase e adenosina deaminase em soro de pacientes esquizofrênicos. 2001. 79 f.

Catálogo-na-Publicação

B899 Brunstein, Miriam Garcia
Sistema purinérgico em esquizofrenia : determinação da atividade das enzimas 5' nucleotidase e adenosina deaminase em soro de pacientes esquizofrênicos / Miriam Garcia Brunstein. - 2001.
79 f.

Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Medicina: Clínica Médica, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.

1. Esquizofrenia - Diagnóstico 2. Esquizofrenia - Etiologia 3. Esquizofrenia - Quimioterapia
4. 5'-nucleotidase 5. Adenosina desaminase I. Título

CDD 616.898 2
NLM WM 203

(Bibliotecária responsável: Viviane Castanho - CRB-10/1130)

SUMÁRIO

Identificação.....	2
Agradecimentos.....	4
Introdução.....	6
Revisão da Literatura.....	11
Hipótese Dopaminérgica.....	11
Hipótese Serotoninérgica.....	13
Hipótese Glutamatérgica.....	14
Hipótese dos Fosfolipídios de Membrana.....	17
Hipótese Purinérgica.....	18
Evidências da Alterações do Sistema Purinérgico na Esquizofrenia.....	23
Metabolismo da Adenosina	26
Ecto-5'-nucleotidase	28
Adenosina Deaminase	30
Hipótese.....	32
Objetivos.....	33
Referências bibliográficas da Revisão da Literatura.....	34
Artigo Científico em Inglês.....	43
Artigo Científico em Português.....	58
Anexos.....	75

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. Paulo Belmonte-de-Abreu pelo constante estímulo e incentivo desde o curso de medicina.

Ao amigo e colega Diogo Lara pelas idéias, entusiasmo e parceria, que foram essenciais para realizar esse trabalho.

Ao Érico Silveira Jr., bolsista de iniciação e amigo, pela disponibilidade e dedicação com os quais se envolveu no trabalho.

À Letícia Chaves, bolsista de iniciação, pela ajuda, em especial na coleta dos dados.

À Maria Inês Lobato, pela amizade e apoio de tantas horas.

À equipe do Prodesq, em especial, à Ana Lúcia Baron e Clarissa Gama.

Ao Ambulatório de Esquizofrenia e seus pacientes, sem os quais essa tese não teria sentido. Um agradecimento especial aos pacientes que colaboraram diretamente com o estudo e seus familiares.

À Carmem e Rosane, secretárias da zona 8, pela paciência e dedicação ao Ambulatório de Esquizofrenia.

À AGAFAPE, Associação dos Familiares de Pacientes portadores de Esquizofrenia, pelo aprendizado e motivação em seguir estudando essa patologia.

Ao Prof. Diogo Souza pelo apoio e acolhida em seu laboratório.

Ao pessoal do Laboratório de Bioquímica do Prof. Diogo, em especial ao Roska, pelo apoio e constante bom humor.

Ao Laboratório Weinmann, em especial, ao Dr Olivir Schenkel e ao Homero Machado, pelo profissionalismo e interesse com os quais participaram deste trabalho.

Ao Dr. Mário Wagner pelo auxílio na parte estatística.

Às amigas e colegas de pós-graduação Gabriela Vanin, Natália Paczko e Lenara Golbert pela amizade de tantos anos e momentos de estudo desde a prova de seleção.

Ao curso de Pós-Graduação em Medicina: Clínica Médica, seus professores e funcionário pelo aprendizado e por toda estrutura disponibilizada.

À CAPES pela concessão da bolsa.

Ao meu irmão, Cláudio Garcia Brunstein, pelo constante estímulo profissional e para pesquisa, desde o início da faculdade de medicina.

Aos meus amados pais, Sueli e Bernardo, por todo amor, apoio e sabedoria.

Introdução

A Esquizofrenia é uma grave doença neuropsiquiátrica, altamente incapacitante, que acomete em torno de 1% da população sem distinção de raça ou classe social. No Brasil a esquizofrenia ocupa 30% dos leitos psiquiátricos hospitalares, ou cerca de 100.000 leitos-dia. R

epresenta o segundo lugar das primeiras consultas psiquiátricas ambulatoriais brasileiras (14 %), e o 5º lugar na manutenção de auxílio-doença no Brasil (Cerqueira, 1984).

O diagnóstico de esquizofrenia é complexo, sendo baseado em características clínicas e levando em conta vários aspectos como sintomatologia, curso e exclusão de outros diagnósticos médicos. Os critérios foram operacionalizados para uso em pesquisa e clínica pela Associação Psiquiátrica Americana (DSM-IV) (Quadro 1) e pela Organização Mundial da Saúde (CID-X). Em ambas classificações diagnósticas os critérios para diagnóstico de esquizofrenia são muito semelhantes.

Como forma de organizar o raciocínio clínico os sintomas são agrupados em três categorias: sintomas positivos, sintomas negativos e de desorganização. Os sintomas positivos são características que os pacientes têm a mais, comparado a indivíduos saudáveis e incluem os delírios e alucinações. Os delírios são alterações do pensamento, idéias infundadas, irrealis e culturalmente não aceitas nas quais o

Quadro 1: Critérios diagnósticos segundo DSM-IV:

Critérios A: Sintomas característicos: dois (ou mais) dos seguintes, cada qual presente persistentemente durante um mês (ou menos se tratado com sucesso):

1. delírios
2. alucinações
3. desorganização da fala (p.ex.: interrupção freqüente ou incoerência)
4. comportamento grosseiramente desorganizado ou catatônico
5. sintomas negativos i.e. embotamento afetivo, alogia ou avolição.

Nota: apenas um sintoma do critério A é necessário se os delírios forem bizarros ou se as alucinações consistirem em uma voz mantendo comentários contínuos sobre comportamento ou pensamentos da pessoa, ou duas ou mais vozes conversando uma com a outra.

Critérios B: Disfunção Social/Ocupacional: Por um período de tempo significativo desde o início do distúrbio, uma ou mais áreas de atividade, tais como o trabalho, relações interpessoais ou cuidados pessoais, estão acentuadamente abaixo do nível alcançado antes do início da doença (ou quando o início for na infância ou adolescência, incapacidade de atingir o

nível esperado de alcance interpessoal, acadêmico ou ocupacional).

Critérios C: Duração: Sinais contínuos de disfunção persistem por pelo menos 6 meses. Esse período de 6 meses deve incluir pelo menos um mês de sintomas característicos (ou menos, se tratado com sucesso) e pode incluir períodos de sintomas prodrômicos e residuais. Durante esses períodos prodrômicos ou residuais os sintomas podem manifestar-se apenas por sintomas negativos ou sintomas do Critério A presentes de forma atenuada (por exemplo: crenças estranhas, experiências perceptivas inusitadas).

Critérios D: Exclusão de Transtorno de Humor ou Esquizoafetivo:

Critérios E: Exclusão do Uso de Substâncias/ Condição Médica Geral: O distúrbio não se deve a efeitos fisiológicos diretos de uma substância (por ex. drogas ilícitas, medicação), ou uma condição médica geral.

paciente acredita com convicção. Os delírios mais comuns em esquizofrenia são de cunho persecutório ou de referência, mas podem apresentar outros conteúdos como delírios de grandeza. Em certos pacientes essas idéias podem ter características bizarras. As alucinações são alterações da sensopercepção que podem envolver um ou mais órgãos dos sentidos. As alucinações mais caracteristicamente apresentadas por estes pacientes são as alucinações auditivas que podem ser vozes (várias ou uma voz apenas) falando com ou fazendo comentários sobre o paciente. Os sintomas negativos são características que faltam aos pacientes esquizofrênicos e incluem sintomas como embotamento afetivo (hipomodulação do afeto), avolição (falta de vontade e iniciativa), anedonia (falta de prazer), alogia (discurso empobrecido), apatia, isolamento social. E sintomas de desorganização como comportamento estranho, por vezes bizarro, pensamento desorganizado, por vezes desagregado, afeto inapropriado (Cancro e Lehmann, 2000).

Para o diagnóstico é necessária a presença de sintomas ao longo de pelo menos seis meses e devem ser excluídas outras doenças que podem produzir sintomas semelhantes, como epilepsia, intoxicações, tumores cerebrais entre outros. Também deve ser excluído o uso de drogas que podem mimetizar ou desencadear sintomas semelhantes como cocaína, anfetaminas e alucinógenos.

Os sintomas surgem caracteristicamente entre os 15 e 25 anos. Não há diferenças entre os sexos quanto à prevalência da doença. No entanto, nas mulheres os sintomas tendem a se manifestar, em média, em torno de 5 anos

mais tarde, havendo um segundo pico de incidência na pós-menopausa (Hafner, 1998). O risco de desenvolvimento de esquizofrenia é maior quando há história familiar da doença, especialmente se há parentesco de primeiro grau ou mais de um membro da família afetado (Kendler, 2000).

O curso da doença é variado, tende a ser crônico, com períodos de reagudização. Na maioria dos pacientes o início é insidioso e se caracteriza por uma mudança no padrão de interação social e do afeto. O paciente percebe e interage com o ambiente de maneira diferente da habitual, sendo que os sintomas positivos e desorganizados aparecem somente meses mais tarde. No entanto, em alguns casos o início é abrupto e com sintomas psicóticos proeminentes.

Não existem até o momento exames complementares que sejam capazes de auxiliar de forma inequívoca no diagnóstico de pacientes individualmente. No entanto, os importantes avanços científicos e tecnológicos das últimas décadas permitiram um maior entendimento da neurobiologia da esquizofrenia. Com isso surgiram evidências experimentais que contribuíram para o desenvolvimento das várias hipóteses neuroquímicas da esquizofrenia.

As hipóteses bioquímicas clássicas postulam que a doença seria resultado de uma alteração na função de um ou mais sistemas neurotransmissores. Os sistemas implicados predominantemente seriam os sistemas dopaminérgico, glutamatérgico e serotoninérgico (Egan e Hyde, 2000). Outras linhas de entendimento, como a que estuda alterações no metabolismo dos fosfolipídios, postulam que a esquizofrenia seria uma doença sistêmica, sendo o cérebro o

órgão mais afetado (Horrobin, 1998). Em 2000, Lara e Souza (Lara e Souza, 2000) propuseram um modelo patofisiopatológico envolvendo o sistema purinérgico que postula que na esquizofrenia haveria uma hipofunção adenosinérgica e que busca integrar diversas hipóteses.

Revisão da Literatura

Hipótese Dopaminérgica

A hipótese baseia-se na idéia de que a esquizofrenia está associada a um estado de hiperatividade dopaminérgica, principalmente na via mesolímbica. Foi desenvolvida a partir da observação de que a anfetamina, um agonista dopaminérgico indireto, podia induzir sintomas psicóticos em pessoas saudáveis (Laruelle et al. 1996). Além disto, observou-se que a potência das medicações antipsicóticas tem relação direta com a sua capacidade de bloquear receptores dopaminérgicos do tipo D2 (Seeman e Tallerico, 1998).

O efeito terapêutico dos antipsicóticos estaria associado ao bloqueio dopaminérgico da via mesolímbica, enquanto os efeitos extrapiramidais estariam relacionados ao bloqueio no estriado (Seeman e Tallerico, 1998). Por outro lado, os sintomas negativos da doença estariam associados a um estado hipodopaminérgico em córtex frontal e não seriam tratados a partir do bloqueio D2 (Egan e Hyde, 2000).

Os estudos neuropatológicos iniciais apontaram um aumento dos receptores D2 que posteriormente ficou atribuído a um aumento reativo (*up-regulation*) por uso prolongado de antipsicóticos (Egan e Hyde, 2000). Embora estudos iniciais *post-mortem* e o primeiro estudo de PET tenham evidenciado uma elevação no número de receptores dopaminérgicos D2 em pacientes esquizofrênicos sem tratamento, esses achados não foram confirmados nos vários

estudos posteriores (Soares e Innis, 1999; Wong et al.1986; Farde et al. 1990; Martinot et al. 1994; Nordström et al. 1995).

Por outro lado, o estado Hiperdominérgico em esquizofrênicos foi evidenciado pela maior liberação de dopamina estimulada por anfetamina (Soares e Innis, 1999) e pela maior ocupação basal de receptores D2 pela dopamina (Abi-Dargham et al. 2000). Além disso, apesar do número de receptores D2 estar inalterado, Müller-Spahn e colaboradores (1998) mostraram que pacientes esquizofrênicos sem tratamento apresentavam um limiar menor a uma resposta fisiológica induzida por apomorfina, um agonista dopaminérgico direto, sugerindo um aumento da afinidade dos receptores dopaminérgicos pela dopamina.

Embora as evidências apontem para um envolvimento do sistema dopaminérgico existem alguns pontos controversos com relação a essa hipótese como: as limitações do tratamento com antagonistas dopaminérgicos; o fato de que usuários crônicos de drogas dopaminérgicas como cocaína e anfetamina não apresentarem o curso observado na esquizofrenia; o fato de que usuários crônicos de outras drogas dopaminérgicas como metilfenidato, bupropiona e amineptina não apresentarem sintomas psicóticos e a ausência, em boa parte dos pacientes, das alterações dopaminérgicas observadas em estudos de PET (Soares e Innis 1999; Abi-Dargham et al. 2000). Sendo assim, o componente hiperdopaminérgico parece ser uma das facetas da patofisiologia de ao menos um grupo de pacientes com esquizofrenia. No entanto, os subtipos de receptores e diversas enzimas do

sistema dopaminérgico não parecem estar primariamente afetados segundo estudos genéticos em esquizofrenia (Kendler, 2000).

Hipótese Serotoninérgica

Um dos primeiros modelos farmacológicos de sintomas psicóticos foi o LSD, uma droga que aumenta a atividade do sistema serotoninérgico (Egan e Hyde, 2000). No entanto, essa substância além de interagir com outros sistemas levava a um quadro psicótico distinto do observado na esquizofrenia. Outro achado foi de que a reserpina, a primeira droga antipsicótica a surgir, levava a uma depleção de serotonina, assim com de dopamina e noradrenalina (Egan e Hyde, 2000).

As interações entre os sistemas serotoninérgico e dopaminérgico se dão em várias regiões anatômicas e por diferentes subtipos de receptores, mas como regra geral observa-se que o sistema serotoninérgico se opõe ao dopaminérgico (Laruelle et al. 1996; Abi-Dargham et al. 2000) ou seja, a inibição da atividade serotoninérgica está associada ao aumento da atividade dopaminérgica em algumas regiões cerebrais.

Outra evidência do envolvimento do sistema serotoninérgico em esquizofrenia é o fato de que a maioria dos antipsicóticos são também antagonistas dos receptores 5-HT₂, alguns antipsicóticos atípicos (como a clozapina, a olanzapina e a risperidona) têm uma relação de antagonismo de receptores 5-HT₂/D₂ bem mais favorável aos receptores 5-HT₂. Esta interação promoveria ao mesmo tempo um bloqueio D₂ pós-sináptico e um aumento da

atividade dopaminérgica sináptica, o que previniria o bloqueio dopaminérgico excessivo responsável pelos efeitos extrapiramidais e trataria o suposto estado hipodopaminérgico em córtex frontal, talvez por ativação de receptores D1. No entanto, antagonistas específicos de receptores D2, sem ação serotoninérgica, como amisulprida e sulpirida, também têm características de antipsicótico atípico (Seeman e Talerico, 1998).

As alterações do sistema serotoninérgico encontradas em pacientes esquizofrênicos em geral são pouco consistentes, com exceção da diminuição da densidade do transportador de serotonina em córtex frontal, considerado um índice de inervação serotoninérgica (Abi-Dargham et al., 2000; Laruelle, 1996). Por outro lado, recentemente foi encontrada uma redução do número de receptores serotoninérgicos do tipo 5HT2A em pacientes esquizofrênicos (Ngan et al. 2000) um dos poucos achados diretos envolvendo o sistema serotoninérgico e esquizofrenia.

Hipótese Glutamatérgica

A hipótese glutamatérgica surgiu a partir da evidência de níveis de glutamato diminuídos em esquizofrênicos (Kim et al. 1980), mas este resultado não foi consistentemente replicado em estudos posteriores. A hipótese ganhou novo impulso quando se descobriu que a droga psicotomimética fenciclidina (PCP) bloqueava o canal iônico do receptor NMDA (um subtipo de receptor glutamatérgico). Mais tarde foi observado que outros antagonistas do receptor NMDA como a quetamina também geravam um quadro clínico semelhante à

esquizofrenia tanto em sintomas positivos como negativos (Krystal et al. 1999). Além disso, antagonistas glutamatérgicos exacerbam ou reativam a sintomatologia prévia dos pacientes, ao invés de acrescentar novos sintomas psicóticos, como observado com outros psicotomiméticos (Tamminga, 1998). No entanto, antagonistas NMDA, como a quetamina, raramente induzem alucinações auditivas e com relativa frequência geram bradicinesia e um estado dissociativo qualitativamente diferente da esquizofrenia (Krystal et al. 1999).

A hipótese glutamatérgica, na versão de Olney e Farber (1995), leva em conta os circuitos neuronais onde o glutamato ativa receptores NMDA de neurônios GABAérgicos, que por sua vez mantêm um tônus inibitório sobre vias excitatórias que inervam outras áreas corticais e subcorticais, principalmente do sistema límbico. O bloqueio dos receptores NMDA deste circuito diminuem a inibição GABAérgica sobre essas vias excitatórias, o que leva a uma hiperestimulação corticolímbica errática. Deste modo, alterações primárias nos neurônios GABAérgicos seriam equivalentes ao estado de hipofunção NMDA, levando às mesmas disfunções. Um achado relevante neste aspecto é a diminuição de neurônios GABAérgicos no córtex cerebral de esquizofrênicos (Benes et al. 1991)

No entanto, o estudo deste sistema em pacientes esquizofrênicos tem produzido resultados inconsistentes, dando origem tanto a hipóteses hipo (Olney & Farber 1995) como hiperglutamatérgicas (Deakin et al. 1989). Recentemente, Moghaddam e cols (1997) mostraram que antagonistas NMDA (quetamina e

fenciclidina) induzem uma liberação de glutamato, levando à hiperestimulação dos receptores não-NMDA (AMPA e cainato).

Do ponto de vista do tratamento, Heresco-Levy e cols. demonstraram que o tratamento adjuvante de pacientes esquizofrênicos com glicina, um potencializador da atividade do receptor NMDA, reduzia sintomas negativos, sem alterar sintomas positivos (Heresco-Levy et al. 1999) apesar de ser ineficaz em pacientes em tratamento com clozapina (Evins et al. 2000)

Além disso, antagonistas de receptores não-NMDA inibem a hiperlocomoção e neurotoxicidade induzidas por antagonistas NMDA (Ngan et al., 2000; Hauber e Andersen, 1993) e os efeitos bioquímicos (aumento de glutamato extracelular, mas não de dopamina), comportamentais e cognitivos da fenciclidina foram revertidos em ratos por um agonista dos receptores glutamatérgicos metabotrópicos tipo II/III (Moghaddam e Adams, 1998), que inibe a liberação de glutamato. O paralelo em humanos foi que a lamotrigina, um anticonvulsivante que também inibe a liberação de glutamato, foi capaz de atenuar os efeitos neuropsiquiátricos da quetamina (Anand et al. 2000). Desta forma, pode-se considerar que grande parte dos efeitos dos antagonistas NMDA sejam decorrentes desta liberação de glutamato, levando à hiperatividade dos receptores não-NMDA concomitantemente à hipofunção NMDA.

Esta foi a primeira hipótese a abordar o curso da doença, já que a suscetibilidade ao bloqueio de receptores NMDA surge somente a partir da puberdade e aumenta gradualmente até a idade adulta em ratos. Em humanos é

digno de nota o fato da quetamina, usado como anestésico em crianças, ser capaz de induzir sintomas psicóticos em adultos, mas não em crianças (Olney e Farber, 1995).

Hipótese do Metabolismo do Fosfolipídios

Essa hipótese postula que o metabolismo dos fosfolipídios de membrana estaria alterado nos pacientes esquizofrênicos (Horrobin, 1998). As membranas neurais são basicamente compostas de fosfolipídios, sendo que o crescimento de axônios e dendritos e conexões sinápticas dependem do metabolismo dos fosfolipídios. As fosfolipases dos grupos A2 e C são enzimas particularmente importantes no metabolismo dos fosfolipídios cerebrais. Essa hipótese aborda alguns fenômenos sistêmicos em esquizofrenia como aumento de resistência a doenças inflamatórias (por ex. artrite reumatóide, maior resistência à dor e melhora dos sintomas psicóticos durante episódios de febre).

Alguns estudos mostraram alterações no metabolismo de fosfolipídios em esquizofrênicos (Gattaz et al.1987, Pettegrew et al. 1991), havendo uma diminuição em fosfomonoesteres e fosfato livre e aumento de fosfodiesteres e ATP. Essas alterações afetariam funções associadas à membrana de células do SNC, como liberação e captação de neurotransmissores e produção de segundos mensageiros.

Hipótese Purinérgica

A hipótese purinérgica postula que na esquizofrenia exista uma hipofunção adenosinérgica (Lara e Souza, 2000). Essa hipofunção estaria relacionada tanto com as alterações no sistema dopaminérgico como glutamatérgico, uma vez que esses sistemas interagem amplamente com a adenosina.

O sistema purinérgico envolve os nucleotídeos ATP, ADP e AMP e o nucleosídeo adenosina, assim como os nucleotídeos de guanina. Além de sua reconhecida função no metabolismo energético das células, essas substâncias participam da neurotransmissão e neuromodulação cerebral através da ação de seus dois efetores: adenosina e ATP. O ATP age como neurotransmissor excitatório por ação nos receptores P2 (Brundege e Dunwiddie, 1997). A adenosina age como neuromodulador pela ativação dos receptores P1 que são subdivididos em A1, A2a, A2b e A3 (Figura 1).

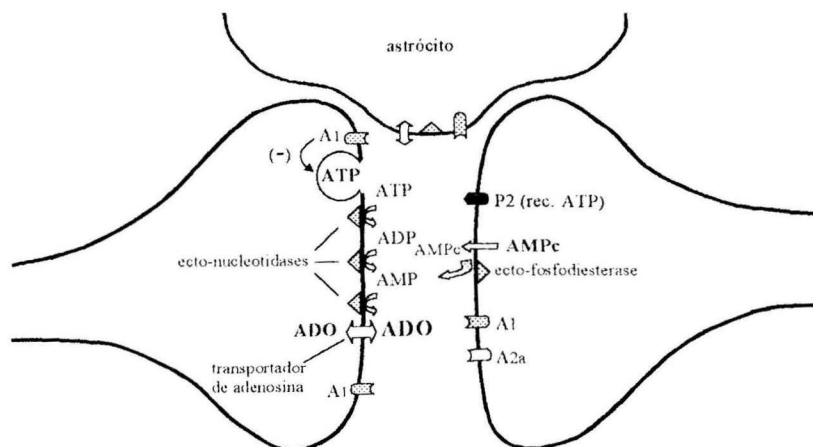


Figura 1. Sistema purinérgico e fontes de adenosina (ADO) extracelular (ATP, adenosina intracelular e AMPc).

Os receptores A1 são amplamente distribuídos no sistema nervoso central e inibem a atividade sináptica e a liberação de diversos neurotransmissores como dopamina, glutamato, serotonina, noradrenalina e acetilcolina (Brundage e Dunwiddie, 1997). Os receptores A2a estão presentes nas regiões cerebrais ricas em dopamina modulando sua atividade através de uma interação antagônica (Ferré, 1997). Os receptores A2b são menos bem caracterizados e assim como os A3 estão relacionados a resposta inflamatória.

O entendimento das interações bioquímicas entre a adenosina e o sistema dopaminérgico é fundamental para a compreensão da hipótese purinérgica da esquizofrenia. A ação bioquímica dos agentes adenosinérgicos é devida

parcialmente às interações adenosina/dopamina (Ferré,1997). Interações diretas entre receptores A2a/D2 e A1/D1 (ação antagônica) levam a mudanças na afinidade dos receptores de DA e seu acoplamento com a proteína-G. Por exemplo, o agonista A2a CGS21680 reduz a afinidade do receptor D2 pelos agonistas de DA e inibe o aumento da atividade locomotora induzida por agonistas D2. Porém, não modifica a hiperlocomoção induzida por agonistas D1 (Ferré, 1997). Da mesma forma, interações opostas entre A1/D1 foram demonstradas *in-vitro* e em experimentos comportamentais. Além disso, a ativação dos receptores A1 pré-sinápticos inibe a liberação da dopamina (Figura 2).

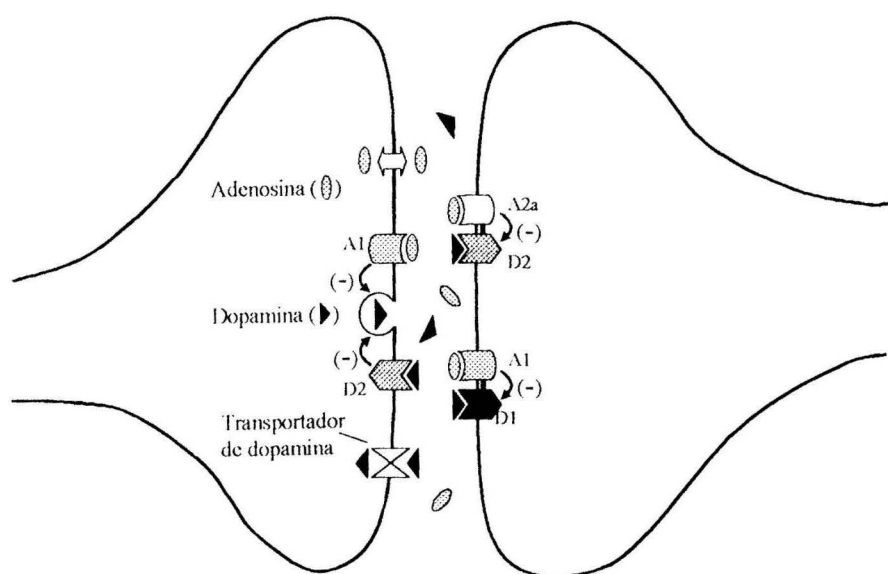


Figura 2. Interação Adenosina-Dopamina

Desta forma, sugere-se que a redução da atividade adenosinérgica pode levar a um estado hiperdopaminérgico pelo aumento da sensibilidade do receptor à DA e pela redução da inibição de liberação de DA via receptores A1, como relatados na esquizofrenia.

Quanto às interações com o sistema glutamatérgico, o glutamato induz acúmulo extracelular de adenosina, sendo que no estriato esse efeito é mediado pelos receptores NMDA (Brundage e Dunwiddie, 1997). Por outro lado, a ativação de receptores A1 inibe a liberação de glutamato. Tanto os efeitos comportamentais como em EEG dos antagonistas NMDA foram prevenidos em roedores pela administração de análogos de adenosina (Browne e Welch, 1982; Popoli et al. 1997; Sills et al. 1999). Como os efeitos comportamentais de antagonistas NMDA parecem estar relacionados à liberação excessiva de glutamato (Moghaddam et al. 1997), o efeito de agonistas de receptores A1 pode se dever à inibição da liberação de glutamato (Figura 3).

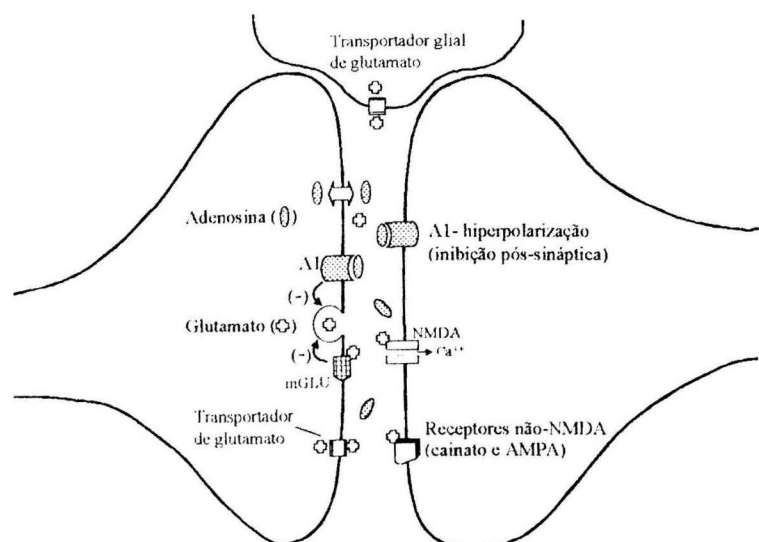


Figura 3. Interação Adenosina-Glutamato

Um resumo dos vários aspectos da esquizofrenia abordados na hipótese purinérgica encontra-se na Tabela 1.

Tabela 1: Comparação entre características da esquizofrenia e funções da adenosina.

Características da Esquizofrenia	Funções da Adenosina/Efeitos de xantinas
Aumento da atividade dopaminérgica ¹	- Adenosina diminui atividade dopaminérgica e exerce tônus inibitório; cafeína induz estado hiperdopaminérgico ²
Anfetamina mimetiza sintomas psicóticos ¹	- Agonistas de adenosina revertem os efeitos comportamentais da anfetamina em modelos animais ²
Antagonistas NMDA produzem sintomas semelhantes à esquizofrenia, possivelmente mediado por aumento da liberação de glutamato ³	- Agonistas de adenosina, especialmente para receptores A1, revertem os efeitos comportamentais e no EEG induzidos por antagonistas NMDA ⁴
Curso deteriorante e neurodegeneração ¹	- Agonistas adenosinérgicos A1 inibem a liberação de glutamato ⁵ - Adenosina é neuroprotetor em muitos modelos animais ⁵
Idade de início – final da adolescência início da idade adulta ¹	- Os efeitos pré-sinápticos na liberação de neurotransmissores tornam-se importantes apenas nas sinapses maduras ⁶
Componente neurodesenvolvimental ⁷	- Purinas têm efeitos tróficos e a 5' NT é necessária para formação neurítica ⁸
Comorbidade com epilepsia ⁹	- Adenosina é um anticonvulsivante endógeno ⁵
Insônia global dos pacientes, especialmente diminuição da atividade delta de 1-2 Hz ¹⁰	- Adenosina é um promotor do sono ^{5,11} - Cafeína produz insônia global, com diminuição da atividade delta de 1-2 Hz em voluntários normais ¹¹
Déficit no filtro sensorial aferido pelo potencial evocado P50 ¹²	- Teofilina mimetiza déficit do filtro sensorial em voluntários saudáveis ¹³
Desempenho prejudicado em testes neuropsicológicos	- Cafeína em dose alta prejudica o desempenho no teste Stroop ¹⁴
Pacientes esquizofrênicos tendem a fumar mais que pessoas sem a doença ¹	- Tratamento crônico com cafeína dobra a ingestão de nicotina e facilita a aquisição do comportamento de auto-administração de nicotina em ratos ¹⁵
Febre melhora sintomas ¹⁹	- Febre aumenta degradação de ATP, gerando adenosina ⁵
Superioridade terapêutica da clozapina ¹	- Clozapina estimula a atividade da 5' NT ¹⁶ - Clozapina age sobre a expressão de <i>c-fos</i> bloqueada pelos antagonistas do receptor A2a ¹⁶
Eficácia do ECT ¹	- ECT libera grande quantidade de adenosina ⁵
Cafeína exacerba os sintomas de esquizofrenia ¹⁷	- Cafeína é bloqueador de receptores A1 e A2 ⁵
Dipiridamol e alopurinol parecem ter efeitos terapêuticos ¹⁸	- Dipiridamol é um inibidor do transportador de adenosina e alopurinol é um inibidor da degradação de purinas ⁵

Referência: **1.** Laruelle, 2000; Lewis e Lieberman, 2000; **2.** Ferre, 1997; **3.** Tamminga, 1998; Moghaddam et al. 1997; Moghaddam e Adams, 1998 **4.** Browne e Welch, 1982; Popoli et al. 1997, Sills et al. 1999 **5.** Brundage e Dunwiddie, 1997; **6.** Dumas e Foster, 1998; **7.** Weinberger, 1995; **8.** Neary et al. 1996; Zimmerman, 1996 **9.** Hyde e Weinberger, 1997; **10.** Keshavan et al. 1998; **11.** Landolt et al. 1995; **12.** Griffith et al. 1998; **13.** Ghisolfi et al. no prelo; **14.** Foreman et al. 1989 **15.** Shoiab et al. 1999 **16.** Pinna et al. 1998; Lara et al. 2001a; **17.** Lucas et al. 1990; **18.** Akhondzadeh et al. 2000; Lara et al. 2001b; **19.** Horrobin, 1998.

Evidências da Alterações do Sistema Purinérgico na Esquizofrenia

Diversas evidências, em especial, derivadas de estudos da área básica relacionam o sistema purinérgico à esquizofrenia. Quanto ao metabolismo, a enzima serina hidroximetil transferase (SHMT), responsável pela produção de adenosina a partir de glicina e grupos metileno, apresentou atividade diminuída (maior Km) no lobo temporal dos pacientes esquizofrênicos, possivelmente afetando os níveis finais de adenosina (Waziri et al. 1993).

Os nucleotídeos cíclicos AMPc e GMPc que são liberados e transformados em adenosina e guanosina também estão diminuídos no líquido de esquizofrênicos sem tratamento (Gattaz et al. 1985).

Recentemente um estudo *post-mortem* mostrou um aumento em receptores A2A estriatais em esquizofrênicos (Kurumaji e Toru, 1998). Apesar do uso crônico de antipsicóticos típicos induzirem *up-regulation* destes receptores em ratos, não houve diferença entre os pacientes que vinham com ou sem tratamento farmacológico anterior. Os autores interpretaram este achado como um aumento compensatório dos receptores A2a em resposta à hiperfunção de receptores D2. No entanto, é contraditório que tanto um estado hipodopaminérgico (induzido por antipsicóticos típicos) como hiperdopaminérgico (esquizofrenia) causem aumento de receptores A2a. Baseado na teoria purinérgica, foi proposto que este resultado seria um clássico *up-regulation* compensatório à diminuição dos níveis de adenosina, que por sua vez produziriam ou contribuiriam para o estado hiperdopaminérgico (Lara e Souza, 2000).

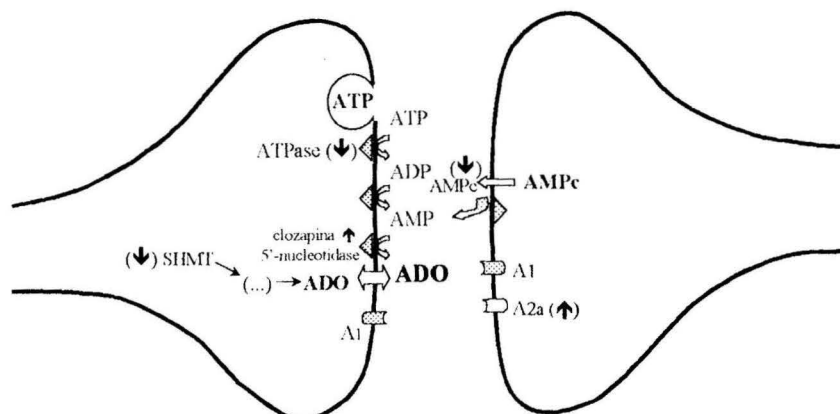


Figura 4. Achados envolvendo o sistema purinérgico na esquizofrenia (↓ e ↑).

ADO = adenosina; SHMT = serina hidroximetil transferase.

Em modelos animais, agonistas de receptores de adenosina demonstraram consistentemente ter um perfil de antipsicótico tanto em modelos dopaminérgicos como glutamatérgicos (Rimondini et al. 1997; Ferré, 1997, Popoli et al. 1997; Browne e Welch, 1982). Além disso, agonistas de adenosina exercem efeito ansiolítico, sedativo, anticonvulsivante (Ralevic e Burnstock, 1998) e anti-agressivo (Ushijima et al., 1984). No entanto, agonistas diretos dos receptores de adenosina seguros e toleráveis não estão disponíveis para uso em humanos.

Na busca de fármacos que aumentem a atividade adenosinérgica em humanos, Akhondzadeh e colaboradores (2000) realizaram um ensaio clínico

randomizado de 8 semanas com 30 pacientes usando dipiridamol, um inibidor do transportador de adenosina, como potencializador de antipsicóticos. Houve melhora significativa nos escores da escala PANSS para sintomas positivos, psicopatologia geral e no escore total. Os autores postulam que o efeito observado seria em função da interação A2a/D2; no entanto, questionamos essa hipótese, já que com alta dose de haloperidol utilizada (20 mg/dia), a atividade dopaminérgica estaria praticamente abolida. Deste modo, em carta ao editor da revista propusemos que o efeito terapêutico observado estaria relacionado a interação adenosina-glutamato (anexo 1 - Brunstein MG, Belmonte-de-Abreu P, Souza DO, Lara DR. Therapeutic benefit of adjunctive dipyridamole in schizophrenia is probably due to adenosine-glutamate interactions. *J Clin Pharm Ther* 2001; 26:155-156).

No mesmo sentido, postulamos que o alopurinol, um inibidor da degradação de purinas, poderia ser benéfico como potencializador em casos de pobre resposta aos antipsicóticos. Assim, nossa equipe realizou um estudo aberto com 11 pacientes esquizofrênicos, dos quais 7 obtiveram alguma resposta clínica, sendo relevante em 5 casos (anexo 2 - Lara DR, Brunstein MG, Ghisolfi E, Lobato MI, Belmonte-de-Abreu P, Souza DO. Allopurinol augmentation for poorly responsive schizophrenia. *Int Clin Psychopharm* 2001).

Metabolismo da Adenosina

Muitos tipos celulares e presumivelmente todos os tecidos tem capacidade de metabolizar nucleotídeos extra-celulares e nucleosídeos por enzimas de superfície. Uma função chave das enzimas é a inativação dos nucleotídeos ou nucleosídeos que foram liberados como substâncias sinalizadoras ou durante processos patológicos ou fisiológicos (Zimmermann, 1996).

A adenosina pode ser formada nos espaços intra e extracelular e a adenosina formada em ambos locais é importante para manutenção dos níveis extracelulares e portanto na sua habilidade de interagir com os receptores e modular a atividade sináptica. Uma vez sintetizada a adenosina pode se difundir através da membrana por difusão facilitada pelo transportador bidirecional de nucleosídeos, gradiente dependente. Sendo assim os níveis extracelulares de adenosina dependem da sua formação, difusão e degradação (Brundege e Dunwinddie, 1997).

A degradação dos nucleotídeos é uma importante fonte de adenosina extracelular (Zimmermann et al. 1998). Essa idéia é reforçada pela observação de que qualquer situação que altere o metabolismo celular induz a liberação de adenosina. Normalmente os níveis de adenosina são muito baixos (moderado a alto nM) e mantidos em equilíbrio com os níveis de nucleotídeos, sendo que o ATP é encontrado na faixa da concentração baixo mM (Brundege e Dunwinddie, 1997).

O ATP intracelular é constantemente desfosforilado em ADP por uma grande variedade de ATPases durante as reações que requerem energia. O ADP

pode ser refosforilado ou transformado em AMP. O AMP por sua vez pode ser defosforilado à adenosina pela ação da enzima 5` nucleotidase (5`NT) (Brundege Dunwinddie, 1997).

A adenosina formada pode entrar em duas rotas metabólicas: refosforilação à AMP pela adenosina quinase ou deaminação em inosina pela enzima ADA. O estado energético da célula e a atividade de 5`NT e da adenosina quinase (AQ) são os fatores dominantes que controlam as concentrações de adenosina. Ambas rotas são importantes em condições de estimulação. Além disso, a degradação da adenosina induz a sua captação para o meio intracelular. Estudos demonstraram que a inibição da AQ leva a um aumento quase imediato dos níveis de adenosina, enquanto a inibição do transportador leva a um aumento gradual da concentração ao longo de uma hora. Já a inibição da ADA leva a um aumento menor nos níveis de adenosina em condições basais, mas é a grande responsável pela metabolização da adenosina quando seus níveis estão elevados. (Km da ADA é em torno de 10 vezes maior que AQ) (Brundege e Dunwinddie, 1997) (Figura 4).

Embora relacionado aos níveis intracelulares, os níveis extracelulares de adenosina podem variar dependendo das condições fisiológicas. Normalmente há uma significativa ativação basal de receptores de adenosina sugerindo que um baixo nível tônico esteja presente. Isso é sugerido pelo efeito excitatório de antagonistas dos receptores de adenosina tanto *in vitro* como *in vivo*. Numerosas condições podem aumentar significativamente a concentração de adenosina extracelular, como condições que inibem o metabolismo celular: hipóxia, isquemia,

estimulação elétrica ou química e ativação dos receptores NMDA. (Brundege e Dunwiddie, 1997).

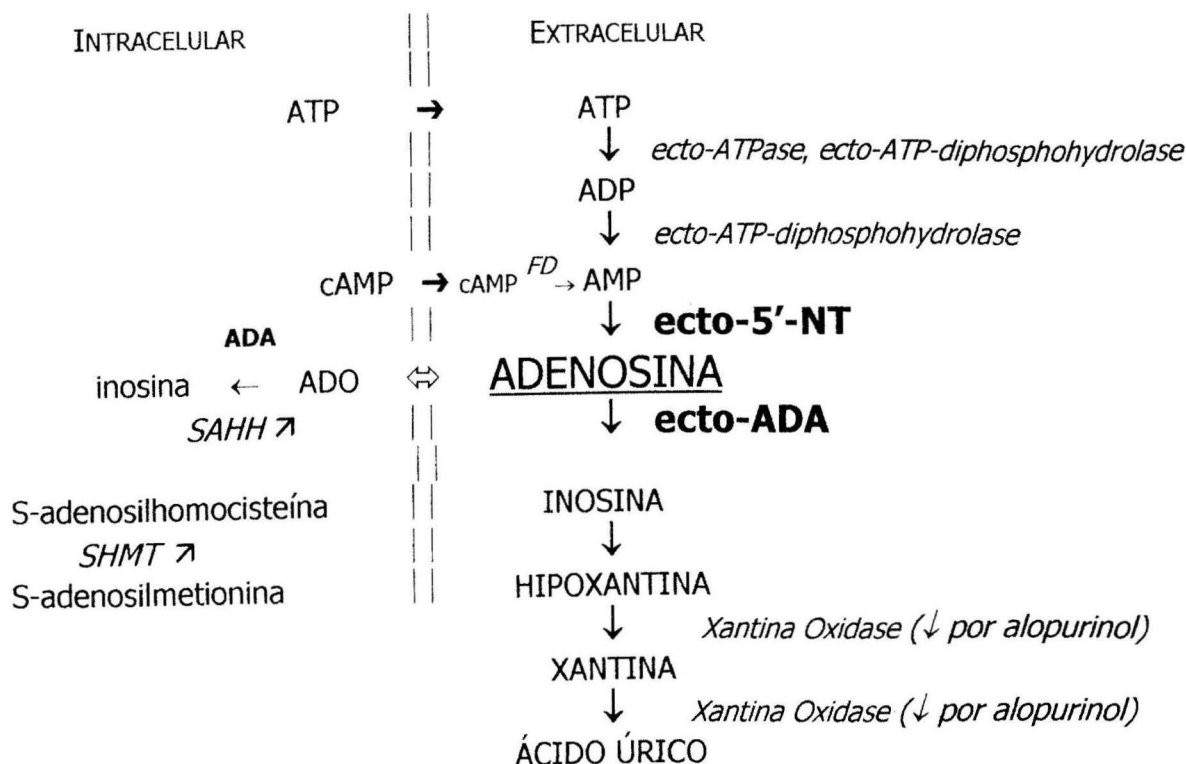


Figura 4 : Metabolismo da Adenosina. SHMT – serina hidroximetiltransferase; SAHH – S-adenosilhomocisteína Hidrolase; FD – fosfodiesterase.

Ecto-5'-nucleotidase (5`NT)

A ecto 5`NT ocorre essencialmente em todos tecidos, sendo sua principal função a produção extracelular de nucleosídeo adenosina a partir de AMP (Zimmermann, 1996), sendo também considerada uma enzima marcadora para membrana plasmática. É uma fosfatase que cataliza a hidrólise dos 5' fosfatos dos nucleosídeos de ribose e desoxiribose em nucleosídeo e fosfato (Moriwaki et al. 1999). Sua atividade é intracelular e extracelular. A ecto-5`NT é ancorada pela glicoproteína GPI que está presente em todos os tecidos, mas sua expressão está

restrita a certos tipos celulares (Zimmermann, 1996). Sua massa molecular varia entre 62 e 74 kDa, a proteína ocorre como um homodímero com ponte dissulfídicas intercadeias. O AMP é o nucleotídeo mais efetivamente hidrolisado, com Km no mais baixo limite micromolar, apesar de hidrolisar também GMP, IMP, UMP, CMP. O ADP e ATP agem como inibidores competitivos com valores de Ki em limites micromolares baixos (Zimmermann, 1996).

No SNC tem distribuição heterogênea e parece tomar parte no catabolismo de ácidos nucleicos e no processo de neurotransmissão (Moriwaki et al. 1999). A 5'NT é expressa transitoriamente na superfície das células nervosas em desenvolvimento e nas sinapses durante seu desenvolvimento e remodelação. A expressão da enzima na superfície de neurônios em migração pode ter importância para interação entre neurônios e também entre o neurônio e a matriz extracelular. Além disso, a 5'NT parece ter efeitos tróficos na extensão neurítica e ser importante na diferenciação e na sobrevivência das células neurais (Zimmermann et al. 1998).

No SNC maduro está especialmente associada às células gliais (Zimmermann, 1996). A expressão da 5'NT aumenta nas células gliais após lesões periféricas ou centrais. A adenosina assim formada pode agir para inibir a liberação de neurotransmissores excitotóxicos, exercendo sua função neuroprotetora e limitando a extensão do dano (Zimmermann et al. 1998).

Clinicamente, a 5'NT pode ser útil no diagnóstico de doença hepatocelular, sendo mais específica do que fosfatase alcalina (Moriwaki et al. 1999).

Adenosina Deaminase (ADA)

A ADA é uma enzima citosólica e pode ocorrer na superfície celular como ecto-ada que degrada a adenosina extracelular. As seqüências proteicas da Ada e ecto-Ada são idênticas. A atividade enzimática depende da atividade celular e diminui com a maturação celular. No entanto, há evidências de que a ecto-Ada tenha também outras funções como ação co-estimulatória (Franco et al. 1997). A ADA exerce um papel importante no desenvolvimento do sistema imune e a sua deficiência está associada a severa imunodeficiência (Moriwaki et al. 1999, Franco et al. 1997).

A ecto-ADA está presente em todos tecidos e entre suas principais funções estão o desenvolvimento do sistema imune, a diferenciação das células epiteliais e monócitos e participação na neurotransmissão. Nos humanos sua maior atividade se dá no timo e baço (Moriwaki et al. 1999, Franco et al. 1997).

A ADA é uma enzima de 41 kDa que cataliza a conversão da adenosina e deoxiadenosina em inosina e deoxiinosina, respectivamente. (Moriwaki et al. 1999; Zimmermann, 1996). Km da enzima para a adenosina é 34 μ M e para deoxiadenosina, 45 μ M (quanto menor o Km, maior a afinidade pelo substrato). Essas substâncias por sua vez são degradadas em hipoxantina, que poderá ser transformada em ácido úrico pela xantina oxidase ou ressintetizada em mononucleotídeos (via de salvamento) pela enzima hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase (Franco et al. 1997).

Não está claro o papel da ADA como enzima catabólica uma vez que crianças com deficiência da enzima tem níveis normais de ácido úrico, produto final do metabolismo das purinas (Franco et al. 1997). O gene da ADA foi identificado no braço longo do cromossoma 20 e tem alto grau de conservação entre espécies. (Franco et al. 1997).

Hipóteses

A hipótese purinérgica preconiza que na esquizofrenia haja uma deficiência adenosinérgica. Esse estado hipoadenosinérgico poderia tanto estar associada à uma disfunção em nível dos receptores de adenosina como no seu metabolismo.

Neste estudo, enfocamos o metabolismo de adenosina baseado na hipótese de que a ADA esteja aumentada e que a 5'NT esteja diminuída em pacientes com esquizofrenia. Por outro lado, com base em estudos em animais, pacientes em tratamento com clozapina apresentariam aumento da atividade da 5'NT.

Objetivos

Baseado na hipótese de hipofunção adenosinérgica da esquizofrenia e no aumento da atividade da enzima 5'NT em ratos tratados cronicamente com clozapina, o presente estudo propõe-se a investigar a atividade das enzimas ADA e 5'NT no soro de pacientes com esquizofrenia em uso de monoterapia com antipsicóticos típicos ou clozapina e controles saudáveis.

Referências bibliográficas da Revisão da Literatura

1. Abi-Dargham A, Rodenhiser J, Zea-Ponce Y, Gil R, Kegeles LS, Weiss R, Cooper TB et al. Increased baseline occupancy of D2 receptors by dopamine in schizophrenia. *Proc Nat Acad Science* 2000; 97:8104-8109.
2. Akhondzadeh S, Shasavand E, Jamilian H, Shabestari O, Kamalipour A. Dipyridamole in the treatment of schizophrenia: adenosine-dopamine receptor interactions. *J Clin Pharm Ther* 2000; 25:131-137.
3. Anand A, Charney D S, Oren D A, Berman R M, Hu X S, Capiello A, Krystal JH. Attenuation of the Neuropsychiatric Effects of Ketymine with Lamotrigine. *Arch Gen Psychiatry* 2000; 57: 270-276.
4. Benes FM, McSparren J, San-Giovanni JP & Vincent SL. Deficits in small interneurons in cingulate cortex of schizophrenic and schizoaffective patients. *Archives of General Psychiatry* 1991; 48: 996-1001.
5. Browne RG, Welch WM. Stereoselective antagonism of phencyclidine's discriminative properties by adenosine receptor agonists. *Science* 1982; 217:1157-9.
6. Brundage JM, Dunwiddie TV. Role of adenosine as a modulator of synaptic activity in the central nervous system. *Adv Pharmacol* 1997; 39:353-391.
7. Brunstein MG, Belmonte-de-Abreu P, Souza DO, Lara DR. Therapeutic benefit of adjunctive dipyridamole in schizophrenia is probably due to adenosine-glutamate interactions. *J Clin Pharm Ther* 2001;26:155-6.

8. Cancro R, Lehmann HE. Schizophrenia: Clinical Features. In: Sadock BJ, Sadock VA, editors. Kaplan & Sadock's comprehensive textbook of psychiatry. 7h ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2000. p. 1169-98.
9. Cerqueira L (1984). *Problemas Brasileiros de Saúde Mental*. Atheneu, RJ.
10. CID-10 Classificação Internacional das Doenças. Divisão de Saúde Mental. Organização Mundial da Saúde. Genebra, 1994.
11. Deakin JF, Slater P, Simpson MD, Gilchrist AC, Skan WJ, Royston MC, Reynolds GP, Cross AJ. Frontal cortical and left temporal glutamatergic dysfunction in schizophrenia. *J Neurochem*. 1989; 52:1781-6.
12. DSM-IV. American Psychiatric Association: Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais. 4ª Edição. Artes Médicas.
13. Dumas T, Foster TC. Late developmental changes in the ability of adenosine A1 receptors to regulate synaptic transmission in the hippocampus. *Dev Brain Res* 1998; 105:137-139.
14. Egan MF, Hyde TM. Schizophrenia: neurobiology. In: Sadock BJ, Sadock VA, editors. Kaplan & Sadock's comprehensive textbook of psychiatry. 7h ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2000. p. 1129-47.
15. Evins AE, Fitzgerald SM, Wine L, Rosselli R, Goff DC. Placebo-controlled trial of glycine added to clozapine in schizophrenia. *Am J Psychiatry* 2000; 157:826-8.
16. Farde L, Wiesel FA, Stone-Elander S, Halldin C, Nordström AL, Hall H & Sedvall G. D2 dopamine receptors in neuroleptic-naive schizophrenic

- patients. A positron emission tomography study with [¹¹C]raclopride. *Archives of General Psychiatry* 1990; 47: 213-219.
17. Ferré S. Adenosine-dopamine interactions in the ventral striatum: implications for the treatment of schizophrenia. *Psychopharmacology* 1997; 133:107-20.
18. Foreman N, Barraclough S, Moore C, Mehta A, Madon M. High doses of caffeine impair performance of a numerical version of the Stroop task in men. *Pharmacol Biochem Behav* 1989;32: 399-403.
19. Franco R. et al. Cell surface adenosine deaminase: much more than an ecto-enzyme. *Progress in Neurobiology* 1997;52: 283-94.
20. Gattaz WF, Gasser T, Beckmann H. Multidimensional analysis of the concentrations of 17 substances in the CSF of schizophrenics and controls. *Biol Psychiatry* 1985; 20:360-6.
21. Gattaz WF, Kollisch M, Thuren T, Virtanen JA, Kinnunen PK. Increased plasma phospholipase A2 activity in schizophrenic patients: reduction after neuroleptic therapy. *Biological Psychiatry* 1987;22: 421-426.
22. Ghisolfi ES, Prokopiuk AS, Becker J, Ehlers JA, Abreu PB, Souza DO, Lara DR. Theophylline disrupts P50 suppression in normal subjects. *Neuropsychopharmacology* – in press.
23. Griffith JM, O'Neill JE, Petty F, Garver D, Young D, Freedman R. Nicotinic receptor desensitization and sensory gating deficits in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 1998, 44:98-106.

24. Hafner H. , et al. Causes and consequences of the Gender Difference in age at onset of schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin* 1998;24: 99-113.
25. Hauber W, Andersen R. The non-NMDA glutamate receptor antagonist GYKI 52466 counteracts locomotor stimulation and anticataleptic activity induced by the NMDA antagonist dizocilpine. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1993;348:486-90.
26. Heresco-Levy U, Javitt DC, Ermilov M, Mordel C, Silipo G, Lichtenstein M et al. Efficacy of high-dose glycine in the treatment of enduring negative symptoms of schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 1999; 56:29-36.
27. Horrobin DF. The membrane phospholipid hypothesis as a biochemical basis for the neurodevelopmental concept of schizophrenia. *Schizophrenia Research* 1998; 30: 193-208.
28. Hyde TM, Weinberger DR. Seizures and schizophrenia. *Schizophr Bull* 1997, 23:611-622.
29. Kendler KS. Schizophrenia: Genetics. In: Sadock BJ, Sadock VA, editors. *Kaplan & Sadock's comprehensive textbook of psychiatry*. 7th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2000. p. 1147-58.
30. Keshavan MS, Reynolds III CF, Miewald JM, Montrose DM, Sweeney JA, Vasko RC, Kupfer DJ. Delta sleep deficits in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 1998, 55:443-448.

31. Kim JS, Kornhuber HH, Schmid-Burgk W & Holzmüller B. Low cerebrospinal fluid glutamate in schizophrenia patients and a new hypothesis on schizophrenia. *Neuroscience Letters* 1980;20: 379-382.
32. Krystal J, Belger A, D'Souza C, Anand A, Charney DS, Aghajanian GK, et al. Therapeutic implications of the hyperglutamatergic effects of NMDA antagonists. *Neuropsychopharmacology* 1999; 21:S143-S157.
33. Kurumaji A, Toru M. An increase in [3H]CGS21680 binding in the striatum of postmortem brains of chronic schizophrenics. *Brain Res* 1998; 808:320-3.
34. Landolt HP, Dijk D, Gaus SE, Borbély AA. Caffeine reduces low-frequency delta activity in the human sleep EEG. *Neuropsychopharmacology* 1995, 12:229-238.
35. Lara DR, Brunstein MG, Ghisolfi ES, Lobato MI, Belmonte-de-abreu P, Souza DO. Allopurinol augmentation for poorly responsive schizophrenia. *Int Clin Psychopharmacol* 2001;16:235-7.
36. Lara DR, Souza DO. Schizophrenia: a purinergic hypothesis. *Med Hypotheses* 2000; 54: 157-166.
37. Lara DR, Vianna MRM, Paris F, Quevedo J, Oses JP, Battastini AMO, Sarkis JJF, Souza DO. Chronic treatment with clozapine, but not haloperidol, increases striatal ecto-5'-nucleotidase activity in rats. *Neuropsychobiology* 2001, 44:99-102.
38. Laruelle M, Abi-Dargham A, van Dyck CH, Gil R, D'Souza CD, Erdos J, McCance E, Rosenblatt W, Fingado C, Zoghbi SS, Baldwin RM, Seibyl JP, Krystal JH, Charney DS & Innis RB. Single-photon emission computerized

- tomography imaging of amphetamine-induced dopamine release in drug-free schizophrenic subjects. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1996; 93: 9235-9240.
39. Laruelle M. The role of endogenous sensitization in the pathophysiology of schizophrenia: implications from recent brain imaging studies. *Brain Res Brain Res Rev.* 2000; 31:371-384.
40. Lewis DA and Lieberman JA. Catching up on schizophrenia: natural history and neurobiology. *Neuron.* 2000; 28:325-334.
41. Lucas PB, Pickar D, Kelsoe J, Rapaport M, Pato C, Hommer D. Effects of the acute administration of caffeine in patients with schizophrenia. *Biol Psychiatry* 1990, 28:35-40.
42. Martinot JL, Paillere-Martinot ML, Loc'h C, Lecrubier Y, Dao-Castellana MH, Aubin F, Allilaire JF, Mazoyer B, Maziere B & Syrota A. Central D2 receptors and negative symptoms of schizophrenia. *British Journal of Psychiatry* 1994; 164: 27-34.
43. Moghaddam B, Adams B, Verma A, Daly D. Activation of glutamatergic neurotransmission by ketamine: a novel step in the pathway from NMDA receptor blockade to dopaminergic and cognitive disruptions associated with the prefrontal cortex. *J Neurosci* 1997; 17:2921-7.
44. Moghaddam B, Adams BW. Reversal of phencyclidine effects by a group II metabotropic glutamate receptor agonist in rats. *Science* 1998; 281:1349-52.

45. Müller-Spanh F, Modell S, Ackenheil M, Brachner A, Kurtz G. Elevated response of growth hormone to graded doses of apomorphine in schizophrenic patients. *J Psychiat Res* 1998;32:265-71.
46. Neary JT, Rathbone MP, Cattabeni F, Abbracchio MP, Burnstock G. Trophic actions of extracellular nucleotides and nucleosides on glial and neuronal cells. *Trends Neurosci* 1996, 19:13-18.
47. Ngan ET, Yatham LN, Ruth TJ, Liddle PF. Decreased serotonin 2A receptor densities in neuroleptic-naive patients with schizophrenia: A PET study using [(18)F]Setoperone. *Am J Psychiatry* 2000; 157:1016-8.
48. Nordström AL, Farde L, Eriksson L & Halldin CA. No elevated D2 dopamine-receptor in neuroleptic naive schizophrenic patients revealed by positron emission tomography and [¹¹C]N-methylspiperone. *Psychiatry Research* 1995; 61: 67-83.
49. Olney JW & Farber NB. Glutamate Receptor Dysfunction and Schizophrenia. *Archives of General Psychiatry* 1995; 52: 998-1007.
50. Pettegrew J, Keshavan MS, Pachalingam K et al. Alterations in brain high-energy phosphate and membrane metabolism in first-episode, drug-naive schizophrenics. *Archives of General Psychiatry* 1991;48: 563-568.
51. Pinna A, Wardas J, Cozzolino A, Morelli M. Involvement of adenosine A2A receptors in the induction of c-fos expression by clozapine and haloperidol. *Neuropsychopharmacology* 1999, 20:44-51.

52. Popoli P, Reggio R, Pèzzola A. Adenosine A1 and A2 receptor agonists significantly prevent the electroencephalographic effects induced by MK-801 in rats. *Eur J Pharmacol* 1997; 333:143-6.
53. Ralevic V, Burnstock G. Receptors for Purines and Pyrimidines. *Pharmacol Rev* 1998; 50: 413-492.
54. Rimondini R, Ferre S, Ogren SO, Fuxe K. Adenosine A2A agonists: a potential new type of atypical antipsychotic. *Neuropsychopharmacol* 1997; 17:82-91.
55. Seeman P & Tallerico T. Atypical antipsychotics which elicit little or no Parkinson bind more loosely to D2 receptors, yet occupy high levels of these receptors. *Molecular Psychiatry* 1998; 3: 123-134.
56. Shoaib M, Swanner LS, Yasar S, Goldberg SR. Chronic caffeine exposure potentiates nicotine self-administration in rats. *Psychopharmacology* 1999; 142:327-333.
57. Sills TL, Azampanah A, Fletcher PJ. The adenosine A1 receptor agonist N6-cyclopentyladenosine blocks the disruptive effect of phencyclidine on prepulse inhibition of the acoustic startle response in the rat. *Eur J Pharmacol* 1999; 369:325-9.
58. Soares JC, Innis RB. Neurochemical brain imaging investigations of schizophrenia. *Biol Psychiatry* 1999; 46:600-15.
59. Tamminga CA. Schizophrenia and glutamatergic transmission. *Critical Reviews in Neurobiology* 1998; 12: 21-36.

60. Ushijima I, Katsuragi T, Furukawa T. Involvement of adenosine receptor activities in aggressive responses produced by clonidine in mice. *Psychopharmacology* 1984, 83:335-339.
61. Waziri R, Baruah S, Sherman AD. Abnormal serine-glycine metabolism in the brains of schizophrenics. *Schizophr Res* 1993; 8:233-43.
62. Weinberger DR. From neuropathology to neurodevelopment. *Lancet* 1995, 346:552-557.
63. Wong DF, Wagner HN Jr, Tune LE, Dannals RF, Pearlson GD, Links JM, Tamminga CA, Broussolle EP, Ravert HT, Wilson AA, et al. Positron emission tomography reveals elevated D2 dopamine receptors in drug-naive schizophrenics. *Science* 1986; 234: 1558-1563.
64. Y. Moriwaki, T. Yamamoto, K. Higashino Enzymes Involved in Purine Metabolism – A review of Histochemical Localization and Functional Implication
Histol Histopathol 1999; 14: 1321-40.
65. Zimmermann H. Extracellular Purine Metabolism. *Drug Development Research* 1996;39:337-352.
66. Zimmermann H.; Braun N.; Kegel B.; Heine P. New insights into the molecular structure and function of ecto-nucleotidases in the nervous system
Neurochemistry International 1998; 32: 421-25.

Increased serum adenosine deaminase activity in schizophrenia

Brunstein MG¹, Silveira Jr EM¹, Chaves LS¹, Homero Machado², Olivir Schenkel²,
Belmonte-de-Abreu P¹, Souza DO³, Lara DR⁴

¹Departamento de Psiquiatria, HCPA, UFRGS, Porto Alegre, Brazil

²Laboratório Weinmann, Porto Alegre, Brazil

³Departamento de Bioquímica, UFRGS, Porto Alegre, Brazil

⁴Departamentos de Bioquímica e Psiquiatria, PUCRS, Porto Alegre, Brazil

Abstract

Adenosine, a neuromodulator of the purinergic system, has recently been proposed to contribute to the pathophysiology of schizophrenia. This hypothesis postulates that there would be a reduced adenosinergic activity in schizophrenia, leading to altered dopaminergic and glutamatergic activities. This alteration could be due to receptor dysfunction or altered metabolism, i.e. decreased production or increased degradation of adenosine. Adenosine exerts neuromodulatory activity of synaptic transmission in the CNS via A1 receptors, which decrease neuronal excitability and inhibit synaptic release of several neurotransmitters, and A2a receptors, which modulate dopaminergic activity. We studied adenosine metabolism by determining the activity of serum adenosine deaminase, which converts adenosine into inosine, in 26 DSM-IV male schizophrenic patients under antipsychotic monotherapy and 26 age/gender/race matched healthy volunteers. Schizophrenic patients treated either with typical antipsychotics or clozapine presented increased serum adenosine deaminase activity compared to controls (controls= 18.96 ± 4.61 U/l; typical= 25.09 ± 10.98 U/l; clozapine= 30.32 ± 10.83 U/l - $p < 0.05$, ANOVA). This result, if confirmed in antipsychotic-free patients, would support the notion that altered adenosinergic activity may be involved in the pathophysiology of schizophrenia.

Key words: schizophrenia, adenosine, adenosine deaminase, purinergic system.

Introduction

The neuromodulator adenosine has been recently proposed to contribute to the pathophysiology of schizophrenia (Lara and Souza, 2000). This hypothesis postulates that there would be a reduced adenosinergic activity in schizophrenia, leading to its putative alterations of dopaminergic and glutamatergic activities. Moreover, the ubiquity of adenosine could also account for some of the systemic alterations reported in schizophrenic patients (Lara and Souza, 2000; Horrobin, 1998).

Adenosine exerts neuromodulatory activity of synaptic transmission in the CNS by activating A1, A2a, A2b and A3 receptors (Brundege and Dunwiddie, 1997). Adenosine A1 receptors, which are widely distributed in the brain, decrease neuronal excitability and inhibit synaptic release of several neurotransmitters such as glutamate, dopamine, acetylcholine, noradrenaline and serotonin (Brundege and Dunwiddie, 1997). Adenosine A2a receptors are concentrated in dopamine-rich areas, modulating D2-mediated dopaminergic activity (Ferré, 1997). The xanthines caffeine and theophylline are the classical non-selective A1/A2a/A2b receptor antagonists (Fredholm et al., 1999).

Extracellular adenosine levels, and consequently receptor activation, depend on the rate of formation, diffusion and degradation of adenine nucleotides (ATP, ADP and AMP) and the nucleoside adenosine (Brundege and Dunwiddie, 1997). AMP formed from the degradation of released ATP can be hydrolyzed to adenosine by the action of ecto-5'-nucleotidase, the rate-limiting step in the

ectonucleotidase chain (Zimmermann et al., 1998). Adenosine can then be either uptaken by nucleoside transporters or deaminated to inosine by ecto-adenosine deaminase. Once inside the cell, adenosine can be converted to AMP by adenosine kinase or deaminated to inosine by adenosine deaminase (Brundege and Dunwiddie, 1997).

The proposed hypoadenosinergic activity in schizophrenia could be due to receptor dysfunction or altered metabolism, i.e. decreased production or increased degradation of adenosine. In line with this hypothesis, postmortem studies have shown that A2a receptors are up-regulated and the enzyme serine-hydroxymethyltransferase, which is involved in adenosine synthesis, is diminished in the brain of schizophrenic patients (Kurumaji and Toru, 1998; Waziri et al., 1993). Also, the adenosine receptor antagonist theophylline produces sensory gating deficits in the P50 suppression paradigm resembling the alterations found in schizophrenic patients (Ghisolfi et al, in press). Regarding pharmacological treatment, adjunctive treatment with dipyridamole, an adenosine transporter blocker, was beneficial compared to placebo for schizophrenia (Akhondzadeh et al., 2000) and chronic treatment with clozapine, but not haloperidol, increased striatal ecto-5'-nucleotidase in rats (Lara et al., 2001).

In this study, we focused on adenosine metabolism by determining the activity of serum adenosine deaminase and 5'-nucleotidase in schizophrenic patients under antipsychotic monotherapy with typical antipsychotics or clozapine and healthy control volunteers.

Subjects and Methods:

Subjects. The protocol was approved by Institutional Review Board of Hospital de Clínicas de Porto Alegre. All patients and an involved family member, as well as controls, provided written informed consent. Twenty-six male outpatients (18 to 52 years-old) with a DSM-IV diagnosis of schizophrenia on antipsychotic monotherapy (14 on typical antipsychotics and 12 on clozapine) and 26 controls were studied. To be included, patients should have no other DSM-IV diagnosis in axis I, no history of drug abuse (except nicotine) or use in the last month and no current medical condition. Controls were recruited from the university and hospital staff, balanced for age and race, without personal history of any axis I diagnosis, no family history of schizophrenia and no first degree relative with any psychotic disorder. Symptoms were evaluated with PANSS scale.

Procedures: Five (5) ml of peripheral blood was obtained by venous puncture with vacuum tubes without anticoagulants. Serum was separated by centrifugation and frozen to -70°C until enzymatic assay. All blood samples were obtained between 4 and 6 p.m. Liver enzymes AST, ALT, γ -glutamyltransferase and alkaline phosphatase as well as uric acid levels were determined for control.

Serum adenosine deaminase activity was measured by a dry chemical technique (Vitro 75° Johnson & Johnson-USA), using reflectance for final

determination (Ellis and Goldberg, 1970). Serum 5'-nucleotidase was measured using the 5'-nucleotidase Sigma kit (St. Louis, Missouri, USA) and processed in a RA XT-Bayer automatic equipment. All samples were analyzed in duplicate. Intra-assay variability was less than 10% for both assays.

Statistical analysis. Between-group comparisons were performed by *t*-test or factorial ANOVA for independent sample characteristics, as appropriate. Enzyme activities and uric acid levels were compared between controls and patients on typical antipsychotics or clozapine with ANOVA, followed by Duncan test. Liver function tests were included as potential confounding factors using a linear regression model. The significance level was determined as 0.05. Analyses were performed with SPSS 8.0 software.

Results

There were no differences between patients and controls regarding age and between patients groups regarding age of onset, number of hospitalizations or PANSS scores. Liver function tests were slightly increased only in patients taking clozapine, being statistically significant for alkaline phosphatase (Table 1).

Schizophrenic patients treated either with typical antipsychotics or clozapine presented increased serum adenosine deaminase activity compared to controls (controls= 18.96 ± 4.61 IU/l; typical= 25.09 ± 10.98 IU/l; clozapine= 30.32 ± 10.83 IU/l -

$p < 0.05$, ANOVA), with no significant differences between both groups of patients. After analysis using a multiple linear regression model with AST, ALT, alkaline phosphatase and γ -glutamyltransferase as confounding factors, this increase remained statistically significant ($p = 0.003$). Considering that the normal values of serum adenosine deaminase activity range between 10 and 25 IU/l (Ellis and Goldberg, 1970), 2/26 in controls, 4/14 in patients on typical antipsychotics and 8/12 patients on clozapine presented abnormally high values (Figure 1).

Regarding 5'-nucleotidase, patients treated with clozapine presented a higher activity compared to controls (controls = 4.8 ± 2.76 IU/l; typical = 5.04 ± 2.15 IU/l; clozapine = 7.33 ± 4.03 IU/l - $p < 0.05$, ANOVA), but after adjusting for potential confounding factors (liver enzymes) using a linear regression model, we found no effect ($p = 0.68$), which is in accordance with the use of serum 5'-nucleotidase as a marker of liver dysfunction (Moriwaki et al., 1999).

We found no correlations between enzyme activities, age of onset, number of hospitalizations and antipsychotic doses.

Discussion

In this study, we found an increased activity of the enzyme adenosine deaminase in the serum of schizophrenic patients on treatment with typical antipsychotics or clozapine. Despite considerable overlap between control and patients values, many patients present a clearly higher activity, especially in the clozapine group. As expected, serum adenosine deaminase was not related to liver enzymes. In contrast, the increased activity of 5'-nucleotidase in patients on clozapine was associated with other alterations of liver enzymes.

Since adenosine deaminase activity is involved in the regulation of adenosine levels in the extracellular milieu and also interacts with A1 receptors (Franco et al., 1997), if adenosine deaminase activity is also increased in the brain of schizophrenic patients, this may lead to altered neuromodulation of the synaptic activity by the adenosinergic system. Alternatively, increased serum adenosine deaminase may reflect T-cell mediated immune alterations, as previously reported in schizophrenia (Sperner-Unterweger et al, 1999). Regarding other psychiatric disorders, leukocytic adenosine deaminase activity was found decreased in patients with major depression, which may be related to impaired immune state (Elgün, 1999), while in the CSF was also found to be positively correlated with the decreased levels of the dopamine metabolite HVA, suggesting that low adenosine

deaminase activity leading to high adenosine content would inhibit dopamine release (Reddy et al, 1992).

Several lines of evidence support the occurrence of adenosine-dopamine interactions, which could account for the hyperdopaminergic state of most schizophrenic patients (Laruelle, 1996). Ferré (1997) has demonstrated direct intramembrane antagonistic interactions of A2a/D2 and A1/D1 receptors. Adenosine A2a receptor agonists reduce the affinity of dopamine D2 receptors for dopamine agonists and inhibit the increased motor activity produced by D2 agonists (Ferré, 1997). This interaction could contribute to the increased occupancy of dopamine D2 receptors by dopamine reported in schizophrenia (Abi-Dargham et al, 2000). Interestingly, Kurumaji and Toru (1998) in a *post-mortem* study has reported an up-regulation of A2a receptors in the striatum of schizophrenic patients. Pre-synaptically, A1 receptors inhibit dopamine release and facilitate the development of prepulse inhibitory deficits in rats, which may also be related to the increased amphetamine-induced release of dopamine in schizophrenia (Laruelle et al, 1996).

Adenosine is also an important neuromodulator of the glutamatergic transmission, inhibiting presynaptic release of glutamate and its post-synaptic action by hyperpolarization (Brundege and Dunwiddie, 1997). Adenosine agonists, especially of the A1 subtype, prevent behavioral as well as neurophysiological effects induced by NMDA antagonists (Browne and Welch, 1982; Popoli et al., 1997), which are considered the best pharmacological model of schizophrenia

(Goff and Wine, 1997). This effect may be due to its inhibitory action on glutamate release, which may mediate the effects of NMDA antagonists (Moghdamm, 1997). It should be noted that adenosine deaminase and A1 receptors are functionally coupled and interact (Franco et al, 1997).

The elevation of serum adenosine deaminase activity may be related to the disease itself or to the use of antipsychotics, which is a limitation of this study design, along with the inclusion of male patients only. Further studies should include drug-naïve and drug-free patients, as well as patients with other psychiatric disorders (e.g. bipolar disorder) to address the issue of disease specificity.

References

1. Abi-Dargham A, Rodenhiser J, Zea-Ponce Y, Gil R, Kegeles LS, Weiss R, Cooper TB et al. Increased baseline occupancy of D2 receptors by dopamine in schizophrenia. *Proc Nat Acad Science* 2000; 97:8104-8109.
2. Akhondzadeh S, Shasavand E, Jamilian H, Shabestari O, Kamalipour A. Dipyridamole in the treatment of schizophrenia: adenosine-dopamine receptor interactions. *J Clin Pharm Ther* 2000; 25:131-7;
3. Browne RG, Welch WM. Stereoselective antagonism of phencyclidine's discriminative properties by adenosine receptor agonists. *Science* 1982; 217:1157-9.
4. Brundege JM, Dunwiddie TV. Role of adenosine as a modulator of synaptic activity in the central nervous system. *Adv Pharmacol* 1997; 39:353-91.
5. Elgün S, Keskinoglu A, Kumbasar H. Dipeptidase IV and adenosine deaminase activity: decrease in depression. *Psychoneuroendocrinology* 1999; 24:823-32.
6. Ellis G., D.M. Goldberg. A Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide-linked Kinetic Assay for Adenosine Deaminase Activity. *J Lab. Clin. Med.* 1970;76: 507-517.
7. Ferré S. Adenosine-dopamine interactions in the ventral striatum: implications for the treatment of schizophrenia. *Psychopharmacology* 1997; 133:107-20.
8. Franco R. et al. Cell surface adenosine deaminase: much more than an ecto-enzyme. *Progress in Neurobiology* 1997; 52: 283-94.

9. Fredholm BB, Bättig K, Holmén J, Nehlig A, Zvartau EE. Actions of Caffeine in the Brain with Special Reference to Factors that contribute to its widespread use. *Pharmacological Reviews* 1999;51(1):83-133.
10. Ghisolfi ES, Prokopiuk AS, Becker J, Ehlers JA, Belmonte-de-Abreu P, Souza DO, Lara DR. The adenosine antagonist theophylline impairs P50 auditory sensory gating in normal subjects. *Neuropsychopharmacology* 2002, in press.
11. Goff DC, Wine L. Glutamate in schizophrenia: clinical and research implications. *Schizophrenia Res* 1997; 27:157-168.
12. Horrobin DF. The membrana phospholipid hypothesis as a biochemical basis for the neurodevelopmental concept of schizophrenia. *Schizophrenia Research* 1998, 30:193-208.
13. Kurumaji A, Toru M. An increase in [3H]CGS21680 binding in the striatum of postmortem brains of chronic schizophrenics. *Brain Res* 1998; 808:320-3.
14. Lara DR, Souza DO. Schizophrenia: a purinergic hypothesis. *Medical Hypotheses* 2000; 54:157-166.
15. Lara DR, Vianna MRM, Paris F, Quevedo J, Oses JP, Battastini AMO, Sarkis JJF, et al. Chronic treatment with clozapine, but not haloperidol, increases striatal ecto-5'-nucleotidase activity in rats. *Neuropsychobiology* 2001;44:99-102.
16. Laruelle M, Abi-Dargham A, van Dyck CH, Gil R, D'Souza CD, Erdos J, McCance E, Rosenblatt W, Fingado C, Zoghbi SS, Baldwin RM, Seibyl JP, Krystal JH, Charney DS & Innis RB. Single-photon emission computerized tomography imaging of amphetamine-induced dopamine release in drug-free schizophrenic subjects. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1996; 93: 9235-40.

17. Moghaddam B, Adams B, Verma A, Daly D. Activation of glutamatergic neurotransmission by ketamine: a novel step in the pathway from NMDA receptor blockade to dopaminergic and cognitive disruptions associated with the prefrontal cortex. *J Neurosci* 1997; 17:2921-7.
18. Moriwaki Y, Yamamoto T, Higashino K. Enzymes involved in purine metabolism – a review of histochemical localization and functional implication. *Histol Histopathol* 1999; 14: 1321-40.
19. Popoli P, Reggio R, Pèzzola A. Adenosine A1 and A2 receptor agonists significantly prevent the electroencephalographic effects induced by MK-801 in rats. *Eur J Pharmacol* 1997; 333:143-6.
20. Reddy PL, Khanna S, Subhash MN, Channabasavanna SM, Rao BS. CSF amine metabolite in depression. *Biol Psychiatry* 1992; 31:112-8.
21. Sperner-Unterweger B, Whitworth A, Kemmler G, Hilbe W, Thaler J, Weiss G, Fleischhacker WW. T-cell subsets in schizophrenia: a comparison between drug-naive first episode patients and chronic schizophrenic patients. *Schizophr Res.* 1999;38:61-70.
22. Waziri R, Baruah S, Sherman AD. Abnormal serine-glycine metabolism in the brains of schizophrenics. *Schizophr Res* 1993; 8:233-43.
23. Zimmermann H.; Braun N.; Kegel B.; Heine P. New insights into the molecular structure and function of ecto-nucleotidases in the nervous system. *Neurochem Intern* 1998;32: 421-25.

Table 1: Clinical and laboratory sample characteristics.

	Controls (n=26)	Patients/Typical Antipsychotic (n=14)	Patients/Clozapine (n=12)	Significance level (p)
Age	31.3 (\pm 7.2)	34.9 (\pm 9.0)	31.0 (\pm 6.2)	0.31
Age of diagnosis		21.6 (\pm 6.7)	18.1 (\pm 4.6)	0.26
N° hospitalizations		4.2 (\pm 5.0)	7.3 (\pm 7.1)	0.45
Total PANSS		62.5 (\pm 21.5)	62.5 (\pm 14.3)	1.00
Drug doses		596 (\pm 331) [#]	518 (\pm 183)	
AST	23.8 (\pm 5.9)	21.1 (\pm 6.1)	25.0 (\pm 7.6)	0.29
ALT	32.4 (\pm 9.6)	31.7 (\pm 10.3)	41.1 (\pm 17.5)	0.09
Alkaline phosphatase	69.0 (\pm 11.5)	78.3 (\pm 16.6)	88.0 (\pm 30.6) [*]	0.02
γ -glutamyltransferase	15.9 (\pm 8.3)	15.6 (\pm 5.5)	21.7 (\pm 10.2)	0.09
Uric Acid	5.6 (\pm 0.8)	5.4 (\pm 1.0)	5.5 (\pm 1.3)	0.89

* = $p < 0.05$ compared to control group

= chlorpromazine equivalents

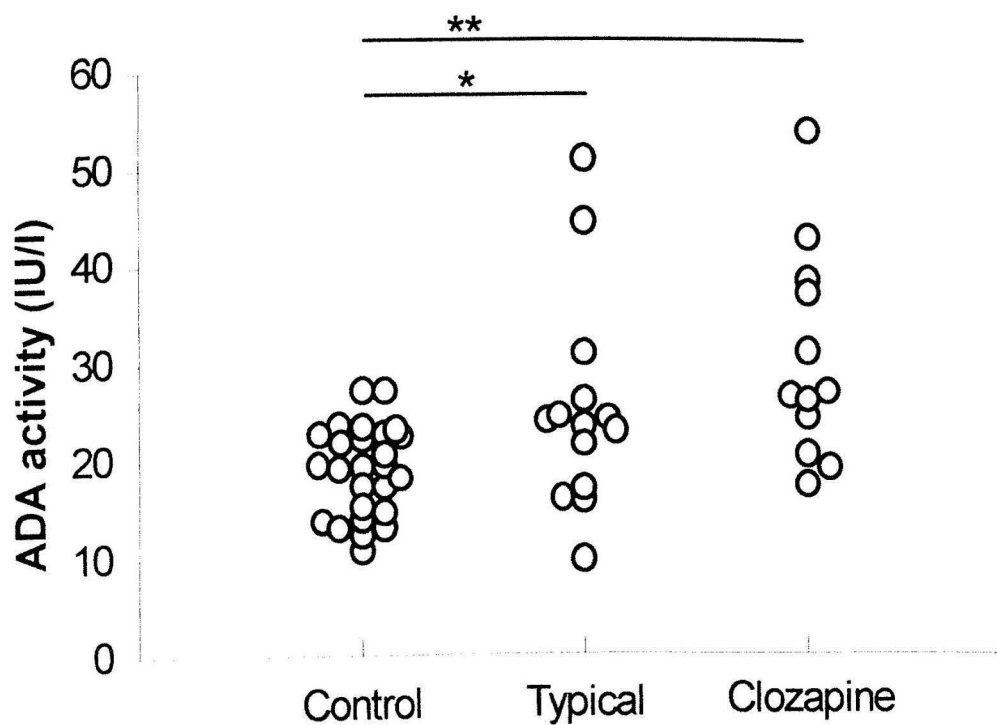


Figure 1: Adenosine deaminase activity in controls (n=26), patients taking typical antipsychotics (n=14) or clozapine (n=12). Mean values (\pm s.d.) were controls= 18.96 ± 4.61 IU/l; typical= 25.09 ± 10.98 IU/l; clozapine= 30.32 ± 10.83 IU/l - $p < 0.05$, ANOVA). Reference values between 10 and 25 IU/l. *= $p < 0.05$; **= $p < 0.01$.

Aumento da atividade da adenosina deaminase sérica em esquizofrênicos

Brunstein MG¹, Silveira Jr EM¹, Chaves LS¹, Homero Machado², Olivir
Schenkel², Belmonte-de-Abreu P¹, Souza DO³, Lara DR⁴

¹Departamento de Psiquiatria, HCPA, UFRGS, Porto Alegre, Brasil

²Laboratório Weinmann, Porto Alegre, Brasil

³Departamento de Bioquímica, UFRGS, Porto Alegre, Brasil

⁴Departamentos de Bioquímica e Psiquiatria, PUCRS, Porto Alegre, Brasil

Resumo

Recentemente foi proposto que a adenosina, um neuromodulador do sistema purinérgico, contribui na patofisiologia da esquizofrenia. Esta hipótese postula que haveria uma reduzida atividade adenosinérgica na esquizofrenia, alterando a atividade dopaminérgica e glutamatérgica. Esta alteração pode relacionar-se a disfunção do receptor ou metabolismo alterado, i.e. produção reduzida ou degradação aumentada de adenosina. A adenosina exerce atividade neuromodulatória da neurotransmissão sináptica via receptores A1, reduzindo a excitabilidade neuronal e a liberação sináptica de diversos neurotransmissores, e via receptores A2a, que modulam a atividade dopaminérgica. Estudamos o metabolismo da adenosina pela determinação da atividade sérica da adenosina deaminase, responsável pela transformação de adenosina em inosina, em 26 pacientes esquizofrênicos, segundo os critérios do DSM-IV, do sexo masculino, em uso de monoterapia antipsicótica e 26 voluntários saudáveis, balanceados para idade, raça e sexo. Os pacientes esquizofrênicos tratados tanto com antipsicótico típico quanto com clozapina apresentaram atividade sérica aumentada de adenosina deaminase comparado aos controles (controles= 18.96 ± 4.61 U/l; típicos= 25.09 ± 10.98 U/l; clozapina= 30.32 ± 10.83 U/l - $p < 0.05$, ANOVA). Este resultado, se confirmado em pacientes sem terapia antipsicótica, corrobora com a hipótese de que a atividade adenosinérgica alterada esteja envolvida na patofisiologia da esquizofrenia.

Palavras chave: esquizofrenia, adenosina, adenosina deaminase, sistema purinergico.

Introdução

Recentemente foi proposto que o neuromodulador adenosina contribui para a patofisiologia da esquizofrenia (Lara and Souza, 2000). Esta hipótese postula que a atividade adenosinérgica estaria reduzida na esquizofrenia, levando às supostas alterações da atividade dopaminérgica e glutamatérgica. Além disso, a presença da adenosina pode estar associada a algumas alterações sistêmicas referidas em pacientes esquizofrênicos (Lara and Souza, 2000; Horrobin).

A adenosina é um importante modulador da atividade sináptica no sistema nervoso central por ativar os receptores A1, A2a, A2b e A3 (Brundege and Dunwiddie, 1997). Os receptores A1 de adenosina, amplamente distribuídos no cérebro, reduzem a excitabilidade neuronal e inibem a liberação sináptica de diversos neurotransmissores, tais como glutamato, dopamina, acetilcolina, noradrenalina e serotonina (Brundege and Dunwiddie, 1997). Receptores A2a de adenosina estão concentrados nas áreas ricas em dopamina, modulando a atividade dopaminérgica mediada por receptores D2 (Ferré, 1997). As xantinas cafeína e teofilina são clássicos antagonistas não-seletivos dos receptores A1/A2a/A2b (Fredholm et al., 1999).

Os níveis extracelulares de adenosina e conseqüentemente a ativação dos seus receptores dependem da taxa de formação, difusão e degradação dos nucleotídeos de adenina (ATP, ADP e AMP) e do nucleosídeo adenosina (Brundege and Dunwiddie, 1997). O AMP formado da degradação do ATP liberado pode ser hidrolizado a adenosina pela ação da ecto-5'-nucleotidase,

etapa limitante na cadeia ecto-nucleotídica (Zimmermann et al., 1998). A adenosina pode então ser absorvida para o interior celular pelos transportadores de nucleosídeos ou deaminada a inosina pela ecto-adenosina-deaminase. Uma vez dentro da célula, a adenosina pode ser convertida a AMP pela adenosina quinase ou deaminada a inosina pela adenosina deaminase (Brundege and Dunwiddie, 1997).

A proposta hipoatividade adenosinérgica na esquizofrenia pode estar associada a uma disfunção dos receptores ou metabolismo alterado, i.e. produção reduzida ou degradação aumentada de adenosina. De acordo com esta hipótese, estudos *post-mortem* demonstram que os receptores A2a estão aumentados e a enzima serina-hidroximetiltransferase, envolvida na síntese de adenosina, está diminuída no cérebro de pacientes esquizofrênicos (Kurumaji and Toru, 1998; Waziri et al., 1993). Com efeito, o antagonista de receptores de adenosina teofilina produz déficit sensorial na supressão do P50, lembrando as alterações encontradas nos pacientes esquizofrênicos (Ghisolfi et al., no prelo). Considerando o tratamento farmacológico, o tratamento adjuvante com dipiridamol, um bloqueador do transporte de adenosina, foi benéfico comparado a placebo na esquizofrenia (Akhondzadeh et al., 2000) e o tratamento crônico com clozapina, mas não haloperidol, aumentou a atividade da ecto-5'-nucleotidase estriatal em ratos (Lara et al., 2001).

Neste estudo, enfocamos o metabolismo de adenosina pela determinação da atividade sérica de adenosina deaminase e 5'-nucleotidase em

pacientes esquizofrênicos em uso de monoterapia com antipsicóticos típicos ou clozapina e controles saudáveis.

Pacientes e Métodos

Pacientes. O protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Todos os pacientes e um membro da família envolvido, bem como os controles, forneceram consentimento informado. Vinte e seis (26) pacientes ambulatorias do sexo masculino (entre 18 e 52 anos de idade) com diagnóstico de esquizofrenia pelo DSM-IV em uso de monoterapia antipsicótica (14 com antipsicóticos típicos e 12 com clozapina) e 26 controles foram estudados. Para serem incluídos os pacientes não deveriam ter outro diagnóstico em eixo I pelo DSM-IV, história de abuso de drogas (exceto nicotina) ou uso no último mês e sem doença médica geral no momento. Os controles foram recrutados do quadro de funcionários e alunos da universidade e do hospital, balanceados para idade e raça, sem história pessoal de qualquer diagnóstico de eixo I pelo DSM-IV ou história familiar de esquizofrenia e sem familiar de primeiro grau com qualquer transtorno psicótico. Os sintomas foram avaliados pela escala PANSS.

Procedimentos. Cinco (5) mL de sangue periférico foram obtidos por punção venosa em tubos a vácuo sem anticoagulantes. O soro foi separado por

centrifugação e congelado a -70°C , até serem feitas as medidas enzimáticas. Todas as amostras sanguíneas foram obtidas entre às 16 e 18 horas. As enzimas hepáticas AST, ALT, γ -glutamilttransferase e fosfatase alcalina e os níveis de ácido úrico foram determinados para controle dos fatores de confusão.

A atividade de adenosina deaminase sérica foi medida pela técnica química a seco (Vitro 75^o Johnson & Johnson-USA), usando reflectância para a análise final (Ellis and Goldberg, 1970). A enzima 5'-nucleotidase sérica foi medida usando o Kit de 5'-nucleotidase da Sigma (St. Louis, MO, EUA) e processado em um equipamento RA XT-Bayer automático. Todas as amostras foram analisadas em duplicata. A variabilidade intra-análise foi menor do que 10% para ambas as análises.

Análise Estatística. A comparação entre os grupos foi realizada pelo test-*t* ou ANOVA para amostras características independentes, quando apropriado. A atividade enzimática e os níveis de ácido úrico foram comparados entre controles e pacientes em monoterapia antipsicótica típica ou clozapina por ANOVA, seguido pelo teste de Duncan. A avaliação das enzimas hepática foram incluídos como fatores de confusão usando um modelo de regressão linear. O nível de significância foi estipulado em 0.05. As análises foram realizadas no programa SPSS 8.0.

Resultados

Não houve diferença entre pacientes e controles quanto à idade e entre o grupo de pacientes quanto à idade de início, número de hospitalizações ou escore da PANSS. Os testes das enzimas hepáticas foram levemente aumentados somente nos pacientes em uso de clozapina, sendo estatisticamente significativo para fosfatase alcalina (Tabela 1).

Pacientes esquizofrênicos tratados com antipsicóticos típicos ou clozapina apresentaram atividade sérica aumentada de adenosina deaminase comparados ao grupo controle (controles= 18.96 ± 4.61 IU/l; típicos= 25.09 ± 10.98 IU/l; clozapina= 30.32 ± 10.83 IU/l - $p < 0.05$, ANOVA), sem diferença estatística significativa entre os grupos de pacientes. Após a análise usando o modelo de regressão linear múltipla com AST, ALT, fosfatase alcalina e γ -glutamilttransferase como fatores de confusão, este aumento permaneceu estatisticamente significativo ($p = 0.003$). Considerando que os valores normais da atividade sérica de adenosina deaminase variam entre 10 e 25 IU/L (Ellis e Goldberg, 1970), 2/26 nos controles, 4/14 nos pacientes em uso de antipsicóticos típicos e 8/12 nos em uso de clozapina apresentaram valores anormalmente alterados (Figura 1).

Em relação à 5'-nucleotidase, os pacientes tratados com clozapina apresentaram uma atividade mais alta comparado aos controles (controles= 4.8 ± 2.76 IU/l; típicos= 5.04 ± 2.15 IU/l; clozapina= 7.33 ± 4.03 IU/l -

$p < 0.05$, ANOVA), porém após o ajuste para os potenciais fatores de confusão (enzimas hepáticas), usando o modelo de regressão linear, não encontramos efeito ($p = 0.68$), o que está de acordo com o uso da 5'-nucleotidase sérica como um marcador de disfunção hepática (Moriwaki et al., 1999).

Não encontramos correlação entre a atividade enzimática, idade de início, número de hospitalizações e doses de antipsicóticos.

Discussão

Neste estudo, encontramos uma atividade aumentada da enzima adenosina deaminase no soro de pacientes esquizofrênicos sob tratamento com antipsicóticos típicos e clozapina. Apesar da considerável sobreposição entre os valores dos controles e pacientes, muitos pacientes apresentaram uma atividade claramente aumentada, especialmente no grupo clozapina. Conforme esperado, a adenosina deaminase sérica não se relacionou às enzimas hepáticas. Já a atividade aumentada da 5'-nucleotidase em pacientes em uso de clozapina associou-se com outras alterações das enzimas hepáticas.

Como a atividade da adenosina deaminase está envolvida na regulação dos níveis de adenosina no ambiente extracelular e interage com os receptores A1 (Franco et al., 1997), se a atividade da adenosina deaminase estiver aumentada no cérebro de pacientes esquizofrênicos, poderia haver uma neuromodulação alterada da atividade sináptica mediada pelo sistema

adenosinérgico. Alternativamente, a adenosina deaminase sérica aumentada pode refletir alterações imunes mediadas por células T, como já relatadas na esquizofrenia (Sperner-Unterweger et al., 1999). Quanto a outros transtornos psiquiátricos, a atividade de adenosina deaminase leucocitária estava diminuída em pacientes com depressão maior, podendo relacionar-se a um déficit imunológico (Elgün, 1999); enquanto no líquido observou-se uma correlação positiva com os níveis diminuídos do metabólito da dopamina HVA, sugerindo que a baixa atividade de adenosina deaminase levaria a um aumento da concentração de adenosina, podendo inibir a liberação de dopamina (Reddy et al., 1992).

Diversas evidências corroboram para a idéia da interação entre adenosina e dopamina, o que poderia levar ao estado hiperdopaminérgico presente na maioria dos pacientes com esquizofrenia (Laruelle, 1996). Ferré (1997) demonstrou uma interação antagônica entre os receptores A2a/D2 e A1/D1. Agonistas dos receptores A2a de adenosina reduzem a afinidade dos receptores D2 de dopamina por agonistas de dopamina e inibem a atividade motora aumentada produzida pelos agonistas D2 (Ferré, 1997). Esta interação poderia contribuir para a ocupação aumentada dos receptores D2 dopamina pela dopamina relatado na esquizofrenia (Abi-Dargham et al., 2000). Interessantemente, Kurumaji and Toru (1998) em um estudo *post-mortem* relataram um aumento dos receptores A2a no estriado de pacientes esquizofrênicos. Em nível pré-sináptico, receptores A1 inibem a liberação de

dopamina e facilitam o desenvolvimento do déficit na inibição por um pré-pulso em ratos, podendo também estar relacionado ao aumento da liberação de dopamina induzida por anfetamina nos esquizofrênicos (Laruelle et al).

A adenosina também é um importante neuromodulador da neurotransmissão glutamatérgica, inibindo a liberação pré-sináptica de glutamato e sua ação pós-sináptica por hiperpolarização (Brundegeand Dunwiddie, 1997). Agonistas de adenosina, especialmente do subtipo A1, previnem alterações comportamentais bem como efeitos neurofisiológicos induzidos pelos antagonistas de receptores NMDA (Browne and Welch, 1982; Popoli et al., 1997), considerado o melhor modelo farmacológico da esquizofrenia (Goff and Wine, 1997). Este efeito pode ser devido à sua ação inibitória na liberação de glutamato, que parece mediar os efeitos dos antagonistas NMDA (Moghdamm, 1997). Deve-se ressaltar que a adenosina deaminase e os receptores A1 estão funcionalmente acoplados e interagem (Franco et al., 1997).

A elevação da atividade da adenosina sérica pode estar relacionada a doença em si ou ao uso de antipsicóticos, sendo uma limitação do delineamento deste estudo, além da inclusão de pacientes apenas do sexo masculino. Novos estudos deverão incluir pacientes sem tratamento farmacológico, bem como pacientes com outros transtornos psiquiátricos (por exemplo, transtorno bipolar) para abordar a especificidade do achado na esquizofrenia.

Referências

24. Abi-Dargham A, Rodenhiser J, Zea-Ponce Y, Gil R, Kegeles LS, Weiss R, Cooper TB et al. Increased baseline occupancy of D2 receptors by dopamine in schizophrenia. *Proc Nat Acad Science* 2000; 97:8104-8109.
25. Akhondzadeh S, Shasavand E, Jamilian H, Shabestari O, Kamalipour A. Dipyridamole in the treatment of schizophrenia: adenosine-dopamine receptor interactions. *J Clin Pharm Ther* 2000; 25:131-7;
26. Browne RG, Welch WM. Stereoselective antagonism of phencyclidine's discriminative properties by adenosine receptor agonists. *Science* 1982; 217:1157-9.
27. Brundage JM, Dunwiddie TV. Role of adenosine as a modulator of synaptic activity in the central nervous system. *Adv Pharmacol* 1997; 39:353-91.
28. Elgün S, Keskiner A, Kumbasar H. Dipeptidase IV and adenosine deaminase activity: decrease in depression. *Psychoneuroendocrinology* 1999; 24:823-32.
29. Ellis G., D.M. Goldberg. A Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide-linked Kinetic Assay for Adenosine Deaminase Activity. *J Lab. Clin. Med.* 1970;76: 507-517.
30. Ferré S. Adenosine-dopamine interactions in the ventral striatum: implications for the treatment of schizophrenia. *Psychopharmacology* 1997; 133:107-120.
31. Franco R. et al. Cell surface adenosine deaminase: much more than an ecto-enzyme. *Progress in Neurobiology* 1997; 52: 283-94.

32. Fredholm BB, Bättig K, Holmén J, Nehlig A, Zvartau EE. Actions of Caffeine in the Brain with Special Reference to Factors that contribute to its widespread use. *Pharmacological Reviews* 1999;51(1):83-133.
33. Ghisolfi ES, Prokopiuk AS, Becker J, Ehlers JA, Belmonte-de-Abreu P, Souza DO, Lara DR. The adenosine antagonist theophylline impairs P50 auditory sensory gating in normal subjects. *Neuropsychopharmacology* 2002, in press.
34. Goff DC, Wine L. Glutamate in schizophrenia: clinical and research implications. *Schizophrenia Res* 1997; 27:157-168.
35. Horrobin DF. The membrana phospholipid hypothesis as a biochemical basis for the neurodevelopmental concept of schizophrenia. *Schizophrenia Research* 1998, 30:193-208.
36. Kurumaji A, Toru M. An increase in [3H]CGS21680 binding in the striatum of postmortem brains of chronic schizophrenics. *Brain Res* 1998; 808:320-3.
37. Lara DR, Souza DO. Schizophrenia: a purinergic hypothesis. *Medical Hypotheses* 2000; 54:157-166.
38. Lara DR, Vianna MRM, Paris F, Quevedo J, Oses JP, Battastini AMO, Sarkis JJF, et al. Chronic treatment with clozapine, but not haloperidol, increases striatal ecto-5'-nucleotidase activity in rats. *Neuropsychobiology* 2001;44:99-102.
39. Laruelle M, Abi-Dargham A, van Dyck CH, Gil R, D'Souza CD, Erdos J, McCance E, Rosenblatt W, Fingado C, Zoghbi SS, Baldwin RM, Seibyl JP, Krystal JH, Charney DS & Innis RB. Single-photon emission computerized tomography imaging of amphetamine-induced dopamine release in drug-free schizophrenic

- subjects. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1996;93: 9235-9240.
40. Moghaddam B, Adams B, Verma A, Daly D. Activation of glutamatergic neurotransmission by ketamine: a novel step in the pathway from NMDA receptor blockade to dopaminergic and cognitive disruptions associated with the prefrontal cortex. *J Neurosci* 1997; 17:2921-7.
41. Moriwaki Y, Yamamoto T, Higashino K. Enzymes involved in purine metabolism – a review of histochemical localization and functional implication *Histol Histopathol* 1999; 14: 1321-40.
42. Popoli P, Reggio R, Pèzzola A. Adenosine A1 and A2 receptor agonists significantly prevent the electroencephalographic effects induced by MK-801 in rats. *Eur J Pharmacol* 1997; 333:143-6.
43. Reddy PL, Khanna S, Subhash MN, Channabasavanna SM, Rao BS. CSF amine metabolite in depression. *Biol Psychiatry* 1992; 31:112-8.
44. Sperner-Unterwieser B, Whitworth A, Kemmler G, Hilbe W, Thaler J, Weiss G, Fleischhacker WW. T-cell subsets in schizophrenia: a comparison between drug-naive first episode patients and chronic schizophrenic patients. *Schizophr Res.* 1999;38:61-70.
45. Waziri R, Baruah S, Sherman AD. Abnormal serine-glycine metabolism in the brains of schizophrenics. *Schizophr Res* 1993; 8:233-43.

46. Zimmermann H.; Braun N.; Kegel B.; Heine P. New insights into the molecular structure and function of ecto-nucleotidases in the nervous system. *Neurochemistry International* 1998;32: 421-25.

Tabela 1: Características clínicas e laboratoriais da amostra.

	Controles (n=26)	Pacientes/ Antipsicóticos Típicos (n=14)	Pacientes/ Clozapina (n=12)	Nível de Significância (p)
Idade	31.3 (\pm 7.2)	34.9 (\pm 9.0)	31.0 (\pm 6.2)	0.31
Idade do Diagnóstico		21.6 (\pm 6.7)	18.1 (\pm 4.6)	0.26
Nº de Hospitalizações		4.2 (\pm 5.0)	7.3 (\pm 7.1)	0.45
Total PANSS		62.5 (\pm 21.5)	62.5 (\pm 14.3)	1.00
Dose das Drogas		596 (\pm 331) [#]	518 (\pm 183)	
AST	23.8 (\pm 5.9)	21.1 (\pm 6.1)	25.0 (\pm 7.6)	0.29
ALT	32.4 (\pm 9.6)	31.7 (\pm 10.3)	41.1 (\pm 17.5)	0.09
Fosfatase Alcalina	69.0 (\pm 11.5)	78.3 (\pm 16.6)	88.0 (\pm 30.6)*	0.02
γ-glutamilttransferase	15.9 (\pm 8.3)	15.6 (\pm 5.5)	21.7 (\pm 10.2)	0.09
Ácido Úrico	5.6 (\pm 0.8)	5.4 (\pm 1.0)	5.5 (\pm 1.3)	0.89

* = $p < 0.05$ comparado com grupo controle

= equivalentes de clorpromazina

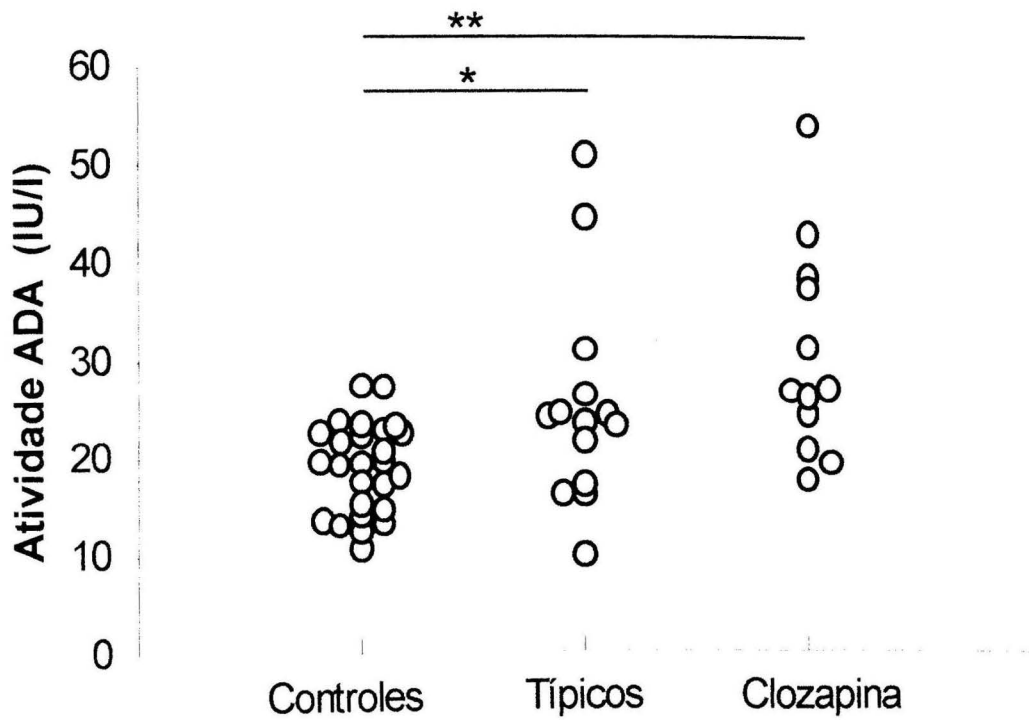


Figura 1: Atividade de adenosina deaminase nos controles (n=26), pacientes em uso de antipsicóticos típicos (n=14) ou clozapina (n=12). Os valores médios (\pm d.p.) foram: controles= 18.96 ± 4.61 IU/l; típicos= 25.09 ± 10.98 IU/l; clozapina= 30.32 ± 10.83 IU/l - $p < 0.05$, ANOVA). Valores de referência entre 10 e 25 IU/L. (* = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$)

Anexo 1:*Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics* (2001) 26, 155–156

LETTER TO THE EDITOR

Therapeutic benefit of adjunctive dipyridamole in schizophrenia is probably due to adenosine–glutamate interactions

M. G. Brunstein*, P. Belmonte-de-Abreu*, D. O. Souza† and D. R. Lara†

**Department of Psychiatry, HCPA, Porto Alegre, Brazil and †Department of Biochemistry, ICBS (UFRGS) and PUCRS, Porto Alegre, Brazil*

Sir,

We read with great interest the clinical trial by Akhondzadeh (1) showing the beneficial effect of dipyridamole as adjunctive therapy for schizophrenia. Dipyridamole, an adenosine uptake inhibitor, associated to 20 mg/day haloperidol was more effective than placebo plus 20 mg/day haloperidol in reducing positive and general psychopathological symptoms, but not negative symptoms. This effect was clear from the 4th week of treatment onwards and there were no adverse reactions reported.

The purinergic system, especially the neuro-modulator adenosine, has been recently suggested to contribute to the neurobiology of schizophrenia (2). According to this hypothesis, a deficit of adenosinergic transmission would lead to a hyperdopaminergic as well as a hyperglutamatergic state, possibly accounting for the symptoms and deteriorating course of the disease (2). Thus, direct agonists, which have a preclinical antipsychotic-like profile, would be the natural choice (3). However, these agents are not available for clinical use and the strategy of enhancing adenosine availability with dipyridamole is quite interesting and available for human use.

The authors attributed the clinical benefit with dipyridamole to the antagonistic interactions between adenosine and the dopaminergic system. Presynaptically, A1 activation inhibits dopamine release and at the postsynaptic level A2a stimulation would reduce D2 receptors' affinity for dopamine (3) in the striatum. However, a D2 occupancy

of 65–70% is obtained with haloperidol doses as low as 2.5 mg and is usually over 80% at higher doses (4). Therefore, increasing adenosine extracellular levels with dipyridamole would probably lead to negligible net reduction of dopaminergic transmission via D2 receptors at haloperidol 20 mg. Additionally, reducing dopaminergic transmission through D1 receptor is not associated with further clinical improvement (5).

We suggest that the therapeutic effect of dipyridamole, if it had been used alone, could be mediated by A1 and A2a receptors, but as haloperidol at high dosage virtually abolishes D2 receptor activity, the observed additional effect is more likely to be independent of dopaminergic neurotransmission. Besides dopamine, adenosine has been shown to inhibit synaptic activity and the release of several neurotransmitters, such as glutamate, acetylcholine and serotonin, by acting on presynaptic A1 receptors (6). Moreover, both A1 and A2a adenosine agonists prevent behavioural and neurophysiological effects of NMDA antagonists (7–12), considered the best pharmacological models of schizophrenia. Interestingly, haloperidol counteracts hyperlocomotion induced by NMDA antagonists at doses that also inhibit spontaneous locomotion (13) and may even worsen their neurophysiological effects (14). The apparent paradox that adenosine A1 agonists inhibit both glutamate release and NMDA antagonist actions is resolved considering recent evidence that (i) NMDA antagonists stimulate glutamate release, leading to hyperactivation of non-NMDA receptors (15, 16) and (ii) glutamate release inhibitors, such as mGLU agonists and lamotrigine (13, 16, 17) reverse their behavioural effects. Finally, A1 receptors are highly expressed in the hippocampus and cerebral cortex and there is significant

Received 18 December 2000, accepted 23 January 2001

Correspondence: Diogo R. Lara, Departamento de Bioquímica-ICBS - UFRGS, Ramiro Barcelos, 2600 (Anexo), Porto Alegre, RS, 90035-003, Brazil. Tel.: +55 51 316 5557; fax: +55 51 316 5540/5535, e-mail: drlara@puers.br

coexpression of adenosine transporter and A1 receptors (18), further indicating that the effect of dipyrindamole may not be restricted to dopaminergic pathways. Supported by CNPq, Pronex (#4196 0904-366/96 to D. O. Souza) and FAPERGS.

REFERENCES

1. Akhondzadeh S, Shasavand E, Jamilian H-R, Shabestari O, Kamalipour A. (2000) Dipyrindamole in the treatment of schizophrenia: adenosine-dopamine receptor interactions. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, **25**, 131-137.
2. Lara DR, Souza DO. (2000) Schizophrenia: a purinergic hypothesis. *Medical Hypotheses*, **54**, 157-166.
3. Rimondini R, Ferre S, Ogren SO, Fuxe K. (1997) Adenosine A2A agonists: a potential new type of atypical antipsychotic. *Neuropsychopharmacology*, **17**, 82-91.
4. Kapur S, Zipursky R, Jones C, Remington G, Houle S. (2000) Relationship between dopamine D2 occupancy, clinical response, and side effects: a double-blind PET study of first-episode schizophrenia. *American Journal of Psychiatry*, **157**, 514-520.
5. Wetzell H, Grunder G, Hillert A, et al. (1998) Amisulpride versus flupentixol in schizophrenia with predominantly positive symptomatology - a double-blind controlled study comparing a selective D2-like antagonist to a mixed D1-/D2-like antagonist. The Amisulpride Study Group. *Psychopharmacology*, **137**, 223-232.
6. Brundage JM, Dunwiddie TV. (1997) Role of adenosine as a modulator of synaptic activity in the central nervous system. *Advances in Pharmacology*, **39**, 353-391.
7. Kafka SH, Corbett R. (1996) Selective adenosine A2a receptor/dopamine D2 receptor interactions in animal models of schizophrenia. *European Journal of Pharmacology*, **295**, 147-154.
8. Browne RG, Welch WM. (1982) Stereoselective antagonism of phencyclidine's discriminative properties by adenosine receptor agonists. *Science*, **217**, 1157-1159.
9. Popoli P, Reggio R, Pèzzola A. (1997) Adenosine A1 and A2 receptor agonists significantly prevent the electroencephalographic effects induced by MK-801 in rats. *European Journal of Pharmacology*, **333**, 143-146.
10. Fraser CM, Fisher A, Cooke MJ, Thompson ID, Stone TW. (1997) Purine modulation of dizocilpine effects on spontaneous alternation. *Psychopharmacology*, **130**, 334-342.
11. Beardsley PM, Balster RL. (1988) Evaluation of antagonists of the discriminative stimulus and response rate effects of phencyclidine. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **244**, 34-40.
12. Sills TL, Azampanah A, Fletcher PJ. (1999) The adenosine A1 receptor agonist N6-cyclopentyladenosine blocks the disruptive effect of phencyclidine on prepulse inhibition of the acoustic startle response in the rat. *European Journal of Pharmacology*, **369**, 325-339.
13. Cartmell J, Monn JA, Schoepp DD. (2000) Attenuation of specific PCP-evoked behaviors by the potent mGlu2/3 receptor agonist, LY379268 and comparison with the atypical antipsychotic, clozapine. *Psychopharmacology*, **148**, 423-429.
14. Feinberg I, Campbell IG. (1998) Haloperidol potentiates the EEG slowing of MK-801 despite blocking its motor effects: implications for the PCP model of schizophrenia. *Neuroreport*, **9**, 2189-2193.
15. Moghaddam B, Adams B, Verma A, Daly D. (1997) Activation of glutamatergic neurotransmission by ketamine: a novel step in the pathway from NMDA receptor blockade to dopaminergic and cognitive disruptions associated with the prefrontal cortex. *Journal of Neuroscience*, **17**, 2921-2927.
16. Moghaddam B, Adams BW. (1998) Reversal of phencyclidine effects by a group II metabotropic glutamate receptor agonist in rats. *Science*, **281**, 1349-1352.
17. Anand A, Charney DS, Oren DA, et al. (2000) Attenuation of the neuropsychiatric effects of ketamine with lamotrigine. *Archives of General Psychiatry*, **57**, 270-276.
18. Deckert J, Bisslerbe JC, Klein E, Marangos PJ. (1988) Adenosine uptake sites in brain: regional distribution of putative subtypes in relationship to adenosine A1-receptors. *Journal of Neuroscience*, **8**, 2338-2349.

Anexo 2:

International Clinical Psychopharmacology 2001, 16:1-3

CASE REPORT

Allopurinol augmentation for poorly responsive schizophrenia

D.R. Lara^{a,b}, M.G. Brunstein^c, E.S. Ghisolfi^{a,c}, M.I. Lobato^c, P. Belmonte-de-Abreu^c and D.O. Souza^a

^aDepartment of Biochemistry, ICBS, UFRGS, Porto Alegre, ^bDepartment of Biochemistry, Faculty of Bioscience, PUCRS, Porto Alegre and ^cDepartment of Psychiatry, HCPA, UFRGS, Porto Alegre, Brazil

Correspondence to Diogo R. Lara, Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS, Rua Ramiro Barcelos, 2600-Anexo, Porto Alegre, RS, 90035-003, Brazil

Tel: +55 51 316 5557; fax: +55 51 316 5540; e-mail: drlara@plug-in.com.br

Received 30 August 2000; accepted 23 January 2001

Adenosine has been proposed to contribute to the pathophysiology of schizophrenia and as a target for therapeutic intervention. In the lack of direct adenosine agonists, allopurinol may indirectly elevate adenosine levels by inhibiting degradation of purines. We report two cases of poorly responsive schizophrenic patients who improved considerably with add-on allopurinol 300 mg/day. Their clear clinical improvement warrant further investigation of allopurinol, as well as other purinergic strategies, for the treatment of schizophrenia. *Int Clin Psychopharmacol* 16:1-3 © 2001 Lippincott Williams & Wilkins

Keywords: allopurinol, adenosine, purinergic system, schizophrenia

INTRODUCTION

Augmentation strategies with lithium (Schulz *et al.*, 1999), carbamazepine (Hesslinger *et al.*, 1999), valproate (Hesslinger *et al.*, 1999) and selegiline (Jungerman *et al.*, 1999) have failed to produce significant benefit beyond the efficacy of antipsychotics in the treatment of schizophrenia, whereas glycine improves negative symptoms (Heresco-Levy *et al.*, 1999) if not associated with clozapine (Evins *et al.*, 2000). Still, the poor pharmacological response of many schizophrenic patients stimulates the search for new adjunctive treatments to antipsychotics.

Adenosine is a neuromodulator of the purinergic system, mainly with inhibitory actions in the CNS (Ralevic and Burnstock, 1998) through widespread A₁ receptors and mesolimbic-striatal A_{2A} receptors, which are colocalized with D₂ receptors (Ferré, 1997). Preclinically, adenosine and analogs exert antipsychotic (Ferré, 1997), anxiolytic, sedative, anti-convulsant (Ralevic and Burnstock, 1998) and anti-aggressive effects (Ushijima *et al.*, 1984). Unfortunately, safe and tolerable direct adenosine agonists are still not available for clinical use in humans. Recently, the combination of haloperidol with the inhibitor of the adenosine transporter dipyridamole

was superior to the combination with placebo in schizophrenic patients (Akhondzadeh *et al.*, 2000).

Allopurinol is an inhibitor of purine degradation that exerts anticonvulsant (Zagnoni *et al.*, 1994) and antiaggressive (Lara *et al.*, 2000) actions, which are compatible with adenosine-enhancing effects. Our group openly used add-on allopurinol (300 mg once a day) in 11 schizophrenic patients (DSM-IV) who were poorly responsive to conventional treatment, with unchanged antipsychotic dosages. Among these, four had no clinical response, two showed mild symptom improvement and five presented clinically relevant improvement evaluated by Clinical Global Impression. We report two of these cases with DSM-IV undifferentiated schizophrenia, which were properly followed with psychopathological scales and significantly improved with add-on allopurinol (300 mg once a day) with unchanged antipsychotic dosages.

CASE REPORTS

Case 1

A 43-year-old male with schizophrenia since the age of 16 years and 19 psychiatric admissions presented

persistent with auditory hallucinations, paranoid delusions, hostility, apathy, social and emotional withdrawal. He had been treated with haloperidol (up to 15 mg), levomepromazine (up to 1200 mg) or fluphenazine depot (up to 50 mg per month) with unsatisfactory response. Augmentation strategies with carbamazepine or valproate were unsuccessful and clozapine was not affordable. Before allopurinol, he was on 500 mg of levomepromazine with Brief Psychiatric Rating Scale (BPRS) (from 1 to 7) score of 64. Improvement of both positive and negative symptoms was observed within the first week of allopurinol addition and BPRS was 30 after 4 weeks and 28 after 8 weeks of treatment. His family reported that his hostile and autistic behaviour ceased and he started helping with domestic tasks, doing some shopping by himself, visiting his sisters and joining meetings of the extended family. Improvement of sleep was also reported and side-effects were not observed.

Case 2

A 37-year-old male whose disease had started when he was aged 19 years, with five psychiatric admissions, presented with mild paranoid behaviour, isolation, poor self-care, blunted affect and avolition. He had been on risperidone 6 mg/day for 2 years, which was slightly better than the previous treatment with haloperidol up to 15 mg/day and his Positive and Negative Syndrome Scale (PANSS) (from 1 to 7) score was 91. He also had persistent insomnia (3–4 h of agitated sleep/day), despite 50 mg of promethazine at bedtime. After 3 weeks of allopurinol, his PANSS decreased to 64 and 3 weeks later to 62. For the first time ever, he played with his 4-year-old niece and, for the first time in the last 15 years, he joined his family on a holiday trip to the beach, went out to restaurants, enrolled in social activities and spontaneously took showers every other day. Moreover, his sleep improved to 8 h a day and no side-effects were reported.

DISCUSSION

These preliminary observations indicate allopurinol as a potential augmentation strategy for schizophrenia. Large series of patients and controlled studies are clearly needed to avoid a time or placebo effect on both patients and clinicians, but the existence of cases with such a beneficial response to low-risk and accessible intervention might be of clinical relevance. To our knowledge, pharmacokinetic interactions with allopurinol leading to higher plasma con-

centrations of antipsychotics have not been described and, even if present, would be unlikely to account for the therapeutic responses observed after addition of allopurinol since (i) doses higher than 500 mg of chlorpromazine equivalents (regarding case 1) and 6 mg of risperidone (regarding case 2) are unlikely to produce further improvement (Mossman, 1997; Nyberg *et al.*, 1999); (ii) these patients had been on higher doses of antipsychotics before without benefit; and (iii) extrapyramidal side-effects were not increased after initiation of allopurinol. Furthermore, as recently reported for lamotrigine in ketamine-induced psychosis (Anand *et al.*, 2000) and as adjunctive treatment for schizophrenia (Dursun *et al.*, 1999), allopurinol may be another drug combining anticonvulsant (Zagnoni *et al.*, 1994) and antipsychotic effects, which agrees the comorbidity between schizophrenia and seizures (Hyde and Weinberger, 1997)

Adenosine has been proposed to contribute to the pathophysiology of schizophrenia (Lara and Souza, 2000) and as a target for therapeutic intervention (Ferré, 1997). Adenosine A₁ and A_{2A} agonists have a clear preclinical antipsychotic profile in dopaminergic and glutamatergic models (Browne and Welch, 1982; Ferré, 1997; Popoli *et al.*, 1997; Andin *et al.*, 1999). Of note, activation of A₁ receptors strongly inhibits glutamate release (Ralevic and Burnstock, 1998), which is a key step underlying the effects of NMDA antagonists (Anand *et al.*, 2000). Moreover, slow-wave sleep alterations observed in schizophrenia (Keshavan *et al.*, 1998) are qualitatively similar to those induced by the adenosine antagonist caffeine in healthy subjects (Landlolt *et al.*, 1998). We speculate that changes in adenosine levels could be related to the sleep improvement we observed with allopurinol, which in fact is not sedative in healthy individuals. Along with the increased striatal A_{2A} receptors found in a post-mortem study (Kurumaji and Toru, 1998), this could indicate a compensatory upregulation process secondary to reduced adenosinergic activity (Lara and Souza, 2000), rendering the purinergic system hypersensitive in schizophrenia.

These cases, despite the clear limitations of such a study design, indicate allopurinol as a potential adjunctive treatment strategy for schizophrenia, meriting further investigation.

Acknowledgements

This research line was supported by CNPq and PRONEX (#41960904).

REFERENCES

- Akhondzadeh S, Shasavand E, Jamilian H, Shabestari O, Kamalipour A (2000) Dipyridamole in the treatment of schizophrenia: adenosine-dopamine receptor interactions. *J Clin Pharm Ther* 25:131-137.
- Anand A, Charney DS, Oren DA, Berman RM, Hu XS, Capiello A, Krystal JH (2000) Attenuation of the neuropsychiatric effects of ketamine with lamotrigine. *Arch Gen Psychiatry* 57:270-276.
- Andine P, Widermark N, Axelsson R, Nyberg G, Olofsson U, Martensson E, Sandberg M (1999) Characterization of MK-801-induced behavior as a putative rat model of psychosis. *J Pharmacol Exp Ther* 290:1393-1408.
- Browne RG, Welch WM (1982) Stereoselective antagonism of phencyclidine's discriminative properties by adenosine receptor agonists. *Science* 217:1157-1159.
- Dursun SM, McIntosh D, Milliken H (1999) Clozapine plus lamotrigine in treatment-resistant schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 56:950.
- Evins AE, Fitzgerald SM, Wine L, Rosselli R, Goff DC (2000) Placebo-controlled trial of glycine added to clozapine in schizophrenia. *Am J Psychiatry* 157:826-828.
- Ferré S (1997) Adenosine-dopamine interactions in the ventral striatum: implications for the treatment of schizophrenia. *Psychopharmacology* 133:107-120.
- Heresco-Levy U, Javitt DC, Ermilov M, Mordel C, Silipo G, Lichtenstein M (1999) Efficacy of high-dose glycine in the treatment of enduring negative symptoms of schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 56:29-36.
- Hesslinger B, Normann C, Langosch JM, Klose P, Berger M, Walden J (1999) Effects of carbamazepine and valproate on haloperidol plasma levels and on psychopathologic outcome in schizophrenic patients. *J Clin Psychopharmacol* 19:310-315.
- Hyde TM, Weinberger DR (1997) Seizures and schizophrenia. *Schizophr Bull* 23:611-622.
- Jungeman T, Rabinowitz D, Klein E (1999) Deprenyl augmentation for treating negative symptoms of schizophrenia: a double-blind, controlled study. *J Clin Psychopharmacol* 19:522-525.
- Keshavan MS, Reynolds CF III, Miewald MJ, Montrose DM, Sweeney JA, Vasko RC Jr, Kupfer DJ (1998) Delta sleep deficits in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 55:443-448.
- Kurumaji A, Toru M (1998) An increase in [³H]CGS21680 binding in the striatum of postmortem brains of chronic schizophrenics. *Brain Res* 808:320-323.
- Landlolt HP, Dijk D, Gaus SE, Borbély AA (1995) Caffeine reduces low-frequency delta activity in the human sleep EEG. *Neuropsychopharmacology* 12:229-238.
- Lara DR, Souza DO (2000) Schizophrenia: a purinergic hypothesis. *Med Hypoth* 54:157-166.
- Lara DR, Belmonte-de-Abreu P, Souza DO (2000) Allopurinol for the treatment of refractory aggression and self-inflicted behavior. *J Psychopharmacol* 14:81-83.
- Mossman D (1997) A decision analysis approach to neuroleptic dosing: insights from a mathematical model. *J Clin Psychiatry* 58:66-73.
- Nyberg S, Eriksson B, Oxenstierna G, Halldin C, Farde L (1999) Suggested minimal effective dose of risperidone based on PET-measured D2 and 5-HT2A receptor occupancy in schizophrenic patients. *Am J Psychiatry* 156:869-875.
- Popoli P, Reggio R, Pèzzola A (1997) Adenosine A1 and A2 receptor agonists significantly prevent the electroencephalographic effects induced by MK-801 in rats. *Eur J Pharmacol* 333:143-146.
- Ralevic V, Burnstock G (1998) Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* 50:413-492.
- Schulz SC, Thompson PA, Jacobs M, Ninan PT, Robinson D, Weiden PJ, et al. (1999) Lithium augmentation fails to reduce symptoms in poorly responsive schizophrenic outpatients. *J Clin Psychiatry* 60:366-372.
- Ushijima I, Katsuragi T, Furukawa T (1984) Involvement of adenosine receptor activities in aggressive responses produced by clonidine in mice. *Psychopharmacology* 83:335-339.
- Zagnoni PG, Bianchi A, Zolo P, Canger R, Cornaggia C, D'Alessandro P (1994) Allopurinol as add-on therapy in refractory epilepsy: a double-blind placebo-controlled randomized study. *Epilepsia* 35:107-112.

UNCITED REFERENCES

Andine et al., 1999; Landlolt et al., 1995