

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Departamento de Bioquímica

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica

Hipótese de Disfunção Adenosinérgica em Esquizofrenia e sua

Avaliação:

Ensaio Clínico de Tratamento Adjuvante com Alopurinol em

Pacientes Esquizofrênicos Refratários

Miriam Garcia Brunstein

Orientador: Prof. Dr. Diogo R. Lara

Tese de Doutorado

Porto Alegre, 2005

Catálogo-na-Publicação

B899 Brunstein, Miriam Garcia
Hipótese de disfunção adenosinérgica em esquizofrenia e sua
avaliação: ensaio clínico de tratamento adjuvante com alopurinol em
pacientes esquizofrênicos refratários / Miriam Garcia Brunstein. – 2005.
??? f.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto
de Ciências Básicas da Saúde. Programa de
Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, 2005.
Orientador: Dr. Diogo Rizzato Lara

1. Esquizofrenia 2. Disfunção : Adenosina 3. Tratamento : Alopurinol I.
Lara, Diogo Rizzato II.Título

NLM WM 203

(Bibliotecária responsável: Elise Maria Di Domenico Coser - CRB-10/1577)

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, colega e amigo Prof. Dr. Diogo Rizzato Lara por todos esses anos de convivência sendo um modelo de pesquisador: curioso, inquieto e ousado; profissional: estudioso, empático e comprometido; e pessoa: alegre, otimista e estimulador do crescimento de todos a sua volta. Por ter sido meu orientador, grande incentivador e parceiro de trabalho, mas acima de tudo um amigo afetuoso e fiel em todas horas.

À Stanley Medical Research Institute pelo financiamento do ensaio clínico.

À Fernanda Lia de Paula Ramos, bolsista de iniciação e amiga, pela disponibilidade, responsabilidade e dedicação com os quais se envolveu no trabalho.

Ao colega Eduardo Sorønsen Ghisolfi pela realização dos estudos de P50 e por ser um exemplo de colega, pesquisador e amigo.

Ao grupo de pesquisa, em especial, à Luísa Bisol, Gustavo Ottoni e Ricardo Vigolo Oliveira, parceiros de pesquisa e amigos.

À Iara, secretária do Ambulatório de Psiquiatria da PUC onde é realizado nosso trabalho clínico.

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

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

Ao Prof. Diogo Souza e pessoal do laboratório pelo apoio e acolhida.

Ao curso de Pós-Graduação em Bioquímica, seus professores e funcionários pelo aprendizado e estrutura disponibilizada.

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

À Maria da Paz que me ajuda a dar sentido.

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

Ao meu amor, Augusto.

SUMÁRIO

Parte I

Resumo.....	1
Abstract.....	2
Lista de Abreviaturas.....	5
Introdução.....	7
Objetivos.....	48

Parte II

Capítulo 1 INVOLVEMENT OF ADENOSINE IN THE NEUROBIOLOGY OF SCHIZOPHRENIA AND ITS THERAPEUTIC IMPLICATIONS.....	49
--	----

Capítulo 2 CLINICAL TRIAL OF ALLOPURINOL ADJUVANT THERAPY FOR MODERATELY REFRACTORY SCHIZOPHRENIA.....	98
--	----

Parte III

Discussão.....	107
Referências Bibliográficas Parte I e III.....	115
Anexo I Consentimento Informado para pacientes	127
Anexo II Normas da Revista Normas para publicação na revista Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry.....	129

RESUMO

A esquizofrenia é uma síndrome neuropsiquiátrica, altamente incapacitante, que acomete em torno de 1% da população, constituindo-se um grave problema de saúde pública. Apesar dos avanços neurocientíficos das últimas décadas, sua neurobiologia e tratamento permanecem um desafio. As evidências sugerem que a esquizofrenia seja uma doença do neurodesenvolvimento que envolve os sistemas dopaminérgico, serotoninérgico e glutamatérgico. O sistema purinérgico é um importante sistema neuromodulador e neuroprotetor do SNC. A adenosina é um efetor desse sistema que tem papel neuromodulador inibitório dos sistemas dopaminérgico, serotoninérgico e glutamatérgico. Em 2000 Lara e Souza propuseram um modelo patofisiopatológico que postula que na esquizofrenia haveria uma hipofunção adenosinérgica, buscando integrar diversas hipóteses.

A presente tese é composta de dois capítulos apresentados sob forma de artigos científicos. O primeiro, intitulado: "Involvement of adenosine in the neurobiology of schizophrenia and its therapeutic implications", apresenta uma revisão da hipótese purinérgica da esquizofrenia à luz dos estudos publicados nos últimos anos na literatura. Propõe que na esquizofrenia haveria uma disfunção adenosinérgica. A adenosina seria a mediadora do dano cerebral precoce, levando a uma redução de receptores A1 e perda de tônus inibitório adenosinérgico sobre outros sistemas neurotransmissores como glutamato. E sugere como modelo farmacológico os antagonistas adenosinérgicos cafeína e teofilina, já com resultados de estudos em animais e de P50 em humanos.

O segundo capítulo, intitulado: “Clinical trial of allopurinol adjuvant therapy for moderately refractory schizophrenia”, apresenta o ensaio clínico randomizado, duplo-cego, cruzado de terapia adjuvante com alopurinol em pacientes esquizofrênicos com resposta pobre aos tratamentos convencionais. Nesse estudo, em uma amostra de 23 pacientes, 9 apresentaram melhora de 20% ou mais nos escores da PANSS total (resposta). A resposta foi mais proeminente para os escores da PANSS para sintomas positivos (11respondedores/23), em pacientes mais jovens e com menor tempo de doença. Com esses resultados demonstramos o efeito terapêutico do alopurinol para o tratamento da esquizofrenia refratária, especialmente dos sintomas positivos. O tratamento com alopurinol foi bem tolerado e seu baixo custo favorece seu uso no sistema de saúde pública. Além disso, seu efeito terapêutico reforça o papel da adenosina e do sistema purinérgico na esquizofrenia, estimulando novos estudos.

PALAVRAS-CHAVE: Esquizofrenia, Adenosina, Cafeína, Glutamato, Dopamina, Neuroproteção, Neurodesenvolvimento, Sistema Purinérgico, Alopurinol.

ABSTRACT

Schizophrenia is a debilitating neuropsychiatric syndrome that affects 1% of the population, being a severe public health problem. Despite the progress in neuroscience in the last decades, its neurobiology and treatment remain challenging. Evidence from epidemiological, neuroimaging and neuropathological studies suggest that schizophrenia is neurodevelopmental disorder, affecting mainly the prefrontal cortex, limbic regions and thalamus. Classical neurochemical

theories involve dopaminergic, glutamatergic and serotonergic systems. The purinergic system is important in the SNC due to its neuromodulatory and neuroprotective functions. Adenosine is a purinergic effector that acts on A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃ receptors to exert inhibitory neuromodulatory actions on dopaminergic, glutamatergic and serotonergic systems. In 2000, Lara and Souza published a pathophysiological model that postulated an adenosine hypofunction in schizophrenia in an integrative model.

This Thesis is composed of two scientific articles or chapters. The first one “Involvement of adenosine in the neurobiology of schizophrenia and its therapeutic implications”, presents an update of the purinergic hypothesis of schizophrenia based on recent literature. States that in schizophrenia there would be a purinergic dysfunction. Adenosine could be the early brain damage mediator leading to a A1 receptor reduction and lost of the adenosinergic inhibitory tonus over other neurotransmitter systems as glutamate. Also, proposes the adenosinergic antagonists caffeine and teophilyne as pharmacological models, with results in animals and P50 in humans.

The second “Clinical trial of allopurinol adjuvant therapy for moderately refractory schizophrenia” presents an add-on, double-blind, randomized, cross-over clinical trial of allopurinol treatment for schizophrenic patients poorly responsive to medication. Nine out of 23 patients improved 20% or more in PANSS scores (response). Response was more pronounced in the positive PANSS scores (11 responders/23), younger patients, with fewer years of disease. With these results we showed the therapeutic efficacy of allopurinol in resistant schizophrenia, especially for positive symptoms. Allopurinol was well tolerated and

its low cost makes it a good option in public health. Furthermore, its therapeutic effect reinforces the schizophrenia, warranting further research.

KEY WORDS: Schizophrenia, Adenosine, Caffeine, Glutamate, Dopamine, Neuroprotection, Neurodevelopment, Purinergic System, Allopurinol.

ABREVIATURAS

5-HT – serotonina

5-HT₂ – receptor de serotonina tipo 2

ADO – adenosina

ADP – adenosina difosfato

AMP – adenosina monofosfato

AMPA – ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico

AMPC – adenosina 3',5'-monofosfato cíclica

ATP – adenosina trifosfato

ATV – área tegmentar ventral

BHE – barreira hemato-encefálica

COMT – catecol-o-metiltransferase

D₁ – receptor de dopamina tipo 1

D₂ – receptor de dopamina tipo 2

DHEA – deidroepiandrosterona

DSM IV – Manual de Diagnóstico e Estatística Edição IV

GLiT-1 – transportador de glicina tipo 1

LSD – ácido lisérgico

NMDA – N-metil-D-aspartato

PCP – fenciclidina

PET – tomografia por emissão de pósitrons

RM – ressonância magnética

RNA_m – ácido ribonucleico mensageiro

SAHS – adenosilhomocisteína

SAHH – S-adenosilhomocisteína hidrolase

SEP – sintoma extrapiramindal

SPECT – tomografia por emissão de fóton único

Parte I

Introdução Geral

INTRODUÇÃO

A esquizofrenia é uma grave síndrome neuropsiquiátrica, altamente incapacitante, que acomete em torno de 1% da população sem distinção de raça ou classe social. No Brasil a esquizofrenia ocupa cerca de 30% dos leitos psiquiátricos hospitalares, ou 100.000 leitos-dia, representa o segundo lugar das primeiras consultas psiquiátricas ambulatoriais (14%), e o 5º lugar na manutenção de auxílio-doença (Cerqueira, 1984). Em estudo multicêntrico de base populacional, a prevalência de transtornos psicóticos ao longo da vida na área metropolitana de Porto Alegre foi de 2,4% (Almeida-Filho et al 1991).

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) (Quadro1) e pela Organização Mundial da Saúde (CID-10). Em ambas classificações os critérios para diagnóstico de esquizofrenia são muito semelhantes.

Quadro 1: Critérios diagnósticos de Esquizofrenia 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 entre si.

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 exemplo: drogas ilícitas, medicação), ou uma condição médica geral.

Como forma de organizar o raciocínio clínico os sintomas são agrupados em três categorias: sintomas positivos, negativos e de desorganização. Os sintomas positivos são características que os pacientes têm a mais quando comparadas 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 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. Por fim, os sintomas de desorganização incluem comportamento estranho, por vezes bizarro, pensamento desorganizado, por vezes desagregado, afeto inapropriado. Sintomas cognitivos como alteração da memória de trabalho e prejuízo na atenção (Buchanan e Carpenter, 2005).

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. A incidência é discretamente maior entre os homens (Buchanan e Carpenter, 2005), sendo que em mulheres os sintomas tendem a se manifestar, em média, em torno de 5 anos mais tarde. Nas mulheres há um segundo pico de incidência na perimenopausa (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. Embora alterações sutis de comportamento, motricidade e cognição tenham sido descritas no período pré-mórbido, os sintomas usualmente se apresentam de maneira mais clara após alguns anos de evolução. Os eventos que desencadeiam a doença propriamente dita não são totalmente conhecidos, mas parecem incluir processos maturativos do SNC como proliferação e migração de neurônios e glia, proliferação axonal e dendrítica, morte

celular programada (apoptose), mielinização axonal, conexões sinápticas; e interações ambientais como doenças físicas ou trauma, estresse psicológico e abuso de substâncias (Weinberger 1995; Lieberman et al, 2001). 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. Em torno de um terço dos pacientes apresentam um prognóstico favorável, um terço apresenta exacerbações e remissões e um terço apresenta curso deteriorante.

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 neurobiológicas.

Neurobiologia da Esquizofrenia

Alterações Anatomofuncionais e Neurodesenvolvimento

A referência de que a esquizofrenia seria o “cemitério dos neuropatologistas” não surgiu devido à falta de achados neuropatológicos, mas sim pela dúvida se os achados, como a diminuição da espessura cortical, eram apenas artefatos, conseqüências da cronicidade da doença ou relacionados às suas causas e processos patológicos. No início do século XX já havia evidências

de alargamento de ventrículos na avaliação por pneumoencefalografia. Esse achado foi confirmado com o surgimento da tomografia computadorizada, que evidenciou que determinados pacientes com esquizofrenia tinham aumento dos ventrículos e sulcos cerebrais, sugerindo perda de tecido. (Weinberger 1995; Buchanan e Carpenter, 2005).

Numerosos estudos de Ressonância Magnética (RM) revelaram anormalidades estruturais incluindo aumento de ventrículos, diminuição do volume das estruturas límbicas como amígdala, hipocampo, córtex entorrinal e tálamo, redução no tecido cerebral cinzento nos córtices pré-frontal e temporal, alterações nas fibras brancas e aumento do volume dos gânglios da base. Sendo que, os déficits no volume de substância cinza já estão presentes em pacientes em primeiro surto, antes do início dos sintomas ou em familiares não afetados. (Weinberger, 1995; Lieberman et al, 2001; Fredman, 2003; Buchanan e Carpenter, 2005; Sawa e Snyder, 2002; Domino et al, 2004; Winterer e Weinberger, 2004).

A redução na matéria cinzenta, no entanto, não parece ser devida a uma redução no número total de neurônios, nem é acompanhada por sinais proeminentes de neurodegeneração ou gliose. Possivelmente é causada por aumento na densidade celular com neurônios corticais e hipocampais menores, menor número de neurônios no tálamo dorsal, diminuição dos marcadores dendríticos e sinápticos em hipocampo, consistente com diminuição de *neuropils* (processos e contatos neurais), sugerindo desorganização celular e má distribuição dos neurônios (Weinberger 1995; Domino et al, 2004; Fredman, 2003; Winterer e Weinberger, 2004; Sawa e Snyder 2002).

A investigação de proteínas sinápticas em tecido pós-mortem dá suporte à idéia de uma alteração da arquitetura sináptica, porém a literatura é caracterizada por diversos achados, nem sempre consistentes. Alguns achados são: redução na expressão de sinapsinas (proteínas das vesículas pré-sinápticas), redução nas enzimas SNAP-25 (proteína associada a sinaptossomas 25), complexina 1, sinapsina 2, diminuição na densidade de espinhas dendríticas e redução na expressão de reelina (Winterer e Weinberger, 2004). A reelina é uma proteína que atua como sinal de 'pare' para a migração neuronal contribuindo para o estabelecimento do padrão cerebral normal. Pacientes com esquizofrenia apresentam 30-50% menor expressão de reelina em córtex pré-frontal e hipocampo (Winterer e Weinberger, 2004; Sawa e Snyder, 2002).

Do ponto de vista genético, diversos loci parecem conferir suscetibilidade para esquizofrenia como: 1q21-22, 1q32-43, 6p24, 8p21, 10p14, 13q32, 18p11 e 22q11-13, o que sugere que haja uma interação entre múltiplos componentes genéticos (Sawa e Snyder, 2002). Esses achados corroboram com a hipótese de que a esquizofrenia seja uma doença neurodesenvolvimental com importante contribuição genética.

A teoria neurodesenvolvimental propõe que fatores etiológicos e patogênicos ocorreriam muito antes do início formal da doença – provavelmente na gestação - e alterariam o neurodesenvolvimento resultando em alterações patológicas específicas nos neurônios e circuitos levando a sua disfunção (Weinberger 1995; Lieberman et al, 2001).

As regiões pré-frontal, límbica e tálamo são as que apresentam achados mais consistentes, como a diminuição das substâncias cinzenta e branca pré-

frontais, anormalidades dos interneurônios corticais pré-frontais, alterações no metabolismo de glicose e fluxo sanguíneo pré-frontal, diminuição do volume do hipocampo e córtex entorrinal e migração anormal dos neurônios hipocampais e entorrinais. Em função dos achados nestas regiões e com a evolução no conhecimento do funcionamento cerebral o conceito de esquizofrenia foi alterando sua perspectiva para a idéia de que a síndrome envolveria uma desorganização dos circuitos cerebrais.

O cérebro é organizado em microcircuitos locais de conexões entre neurônios aferentes, eferentes e interneurônios, que se organizam em macrocircuitos. Cada circuito seria responsável por um grupo de funções específicas. Tanto lesões estruturais como alterações funcionais poderiam estar relacionadas com a alteração do funcionamento do circuito com um todo. Muitos investigadores partem destas alterações para postular hipóteses sobre a patofisiologia da esquizofrenia como, por exemplo, de que as disfunções no circuito tálamo-cortical, gânglios da base e cíngulo anterior estariam subjacentes aos sintomas positivos, enquanto que disfunções pré-frontais dorsolaterais estariam subjacentes aos sintomas negativos (Buchanan e Carpenter, 2005). No entanto, no momento uma teoria elegante para esquizofrenia que integre função, estrutura e neuroquímica ainda não é possível (Domino et al, 2004).

Neuroquímica e Esquizofrenia

A informação processada pelos circuitos neuronais trafega pelo axônio na forma de impulsos elétricos até o terminal sináptico onde é transmitida para célula

seguinte por mecanismos bioquímicos complexos. O processo como um todo envolve um grande número de etapas com gasto de energia, síntese e degradação de proteínas e expressão gênica. Assim, é possível que alterações nestas etapas estejam envolvidas na esquizofrenia.

O aumento da compreensão do funcionamento intracelular entre membrana e material genético, da comunicação entre as células nos diferentes sistemas de neurotransmissores, a expansão do conhecimento sobre a farmacologia dos comportamentos e funções cognitivas e o conhecimento nos mecanismos de ação de drogas que induzem ou tratam sintomas psicóticos proporcionaram o desenvolvimento das hipóteses neuroquímicas da esquizofrenia (Buchanan e Carpenter, 2005). As hipóteses 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, serotoninérgico e glutamatérgico (Buchanan e Carpenter, 2005).

Hipótese Dopaminérgica

A hipótese dopaminérgica foi desenvolvida a partir da observação de que a anfetamina, um agonista dopaminérgico indireto, podia induzir sintomas psicóticos em pessoas saudáveis e exacerbar alucinações, delírios e distúrbios do pensamento em pacientes esquizofrênicos (Laruelle et al, 1996; Domino et al, 2004; Fredman 2003; Abi-Dargham e Laruelle, 2005; Buchanan e Carpenter, 2005). Além disso, drogas com a capacidade de bloquear os receptores pós-sinápticos dopaminérgicos reduzem os sintomas psicóticos dos pacientes com esquizofrenia (Sedvall e Farde 1995; Domino et al, 2004; Fredman, 2003; Abi-

Dargham e Laruelle, 2005; Buchanan e Carpenter, 2005), sendo que a potência das medicações antipsicóticas tem relação direta com a sua capacidade de bloquear receptores dopaminérgicos do tipo D₂ (Seeman e Tallerico, 1998).

As principais projeções dopaminérgicas são divididas em nigroestriatal, mesolímbica e mesocortical. A via nigroestriatal projeta-se da substância *nigra* para o estriato dorsal e está classicamente envolvida na integração cognitiva, habituação, coordenação sensório-motora e iniciação dos movimentos. A via mesolímbica se projeta da área tegmental-ventral (ATV) para estruturas límbicas como estriado ventral (núcleo accumbens e porção ventral do caudado e putâmen) hipocampo e amígdala. A via mesocortical se projeta da ATV para regiões corticais, especialmente orbitofrontal, pré-frontal medial e cingulada, mas também córtex pré-frontal dorso-lateral, temporal e parietal. Os sistemas mesolímbico e mesocortical estão envolvidos na motivação, atenção, recompensa e agressividade (Kapur, 2004).

Como os receptores D₂ estão localizados principalmente em regiões subcorticais como estriado e accumbens, a hipótese clássica implicava essas regiões e sugeria que a hiperatividade dopaminérgica responsável pelos sintomas positivos estivesse localizada em áreas inervadas pelo sistema mesolímbico, por exemplo estriado ventral (Abi-Dargham e Laruelle, 2005; Buchanan e Carpenter, 2005).

Estudos de neuroimagem documentaram a desregulação da função dopaminérgica estriatal em pacientes com esquizofrenia. O aumento da estimulação dos receptores D₂ está associado com surgimento ou piora dos sintomas positivos. Diversos estudos evidenciaram uma maior taxa de dopa-

descarboxilase (enzima envolvida na síntese de dopamina) marcada radioativamente no estriado dos pacientes ou acúmulo de l-dopa em pacientes em psicose. Essas observações são compatíveis com uma síntese aumentada de dopamina em pacientes em surto psicótico, porém a relação entre a atividade da dopa-descarboxilase e da dopamina sináptica não é clara. Estudos de PET e SPECT relataram um aumento da liberação de dopamina induzida por anfetamina em pacientes quando comparados com controles sadios (Abi-Dargham e Laruelle, 2005; Buchanan e Carpenter, 2005; Remy e Samson, 2003; Soares e Innis, 1999). No entanto, esses estudos não informam a respeito da dopamina basal, mas pós-estimulação farmacológica.

A ocupação basal dos receptores de dopamina em estriado foi estudada usando uma estratégia de depleção aguda de dopamina. Os resultados do estudo sugeriram que a dopamina ocupa uma maior proporção de receptores D₂ estriatais de pacientes em primeiro episódio psicótico e em reagudizações subseqüentes, comparados aos controles (Abi-Dargham e Laruelle, 2005). Além disso, um maior nível de dopamina basal foi significativamente associada a uma melhora maior dos sintomas positivos após 6 semanas de tratamento antipsicótico (Abi-Dargham et al, 2000; Fredman, 2003; Abi-Dargham e Laruelle, 2005).

Deste modo os estudos de neuroimagem são consistentes com a existência de uma desregulação da função dopaminérgica estriatal levando a uma hiperestimulação dos receptores D₂ em esquizofrenia.

Estudos de imagem funcional sugerem que os sintomas negativos e cognitivos são conseqüência de alterações nas funções do córtex pré-frontal. Estudos pré-clínicos documentaram a importância da transmissão dopaminérgica

nos receptores D₁ (principal receptor de dopamina em neocórtex) para o funcionamento do córtex pré-frontal (Abi-Dargham e Laruelle, 2005). Essas observações levaram à hipótese de que a deficiência na transmissão da dopamina em receptores D₁ no córtex pré-frontal pode estar envolvida nos sintomas negativos e cognitivos da esquizofrenia.

A relevância da dopamina pré-frontal para as funções cognitivas foi recentemente confirmada em humanos por estudos que demonstraram que portadores do alelo Val da enzima catecol-o-transferase (COMT), apresentaram desempenho mais baixo em várias tarefas cognitivas comparados aos portadores do alelo Met. COMT é uma enzima fundamental na modulação dos níveis de dopamina cortical, sendo que portadores do alelo Val apresentam níveis mais baixos de dopamina comparados aos portadores do alelo Met (Sawa e Snyder 2002; Abi-Dargham e Laruelle, 2005). Um dado interessante é de que o gene que codifica a COMT localiza-se na região 22q11 um dos loci de suscetibilidade para esquizofrenia.

No entanto, as evidências de que a esquizofrenia está associada à baixa atividade da dopamina pré-frontal são indiretas. Estudos clínicos sugerem relação entre baixos níveis de ácido homovanílico (metabólito da dopamina) em líquor - uma dosagem que sugere baixa atividade da dopamina pré-frontal - e desempenho ruim em tarefas envolvendo memória de trabalho em esquizofrenia. Administração de agonistas de dopamina pode melhorar o padrão de ativação pré-frontal avaliado por PET durante a execução dessas tarefas. Os estudos de imagem avaliando a disponibilidade dos receptores D₁ apresentam resultados

ainda inconclusivos. Porém, estudos de PET de *binding* de D₁ em córtex pré-frontal, foram consistentes com redução da densidade de D₁ e um déficit mantido da função dopaminérgica nesta região (Sedvall e Farde, 1995; Remy e Samson, 2003; Fredman, 2003; Domino et al, 2004). As evidências são compatíveis com a hipótese de que um déficit da atividade dopaminérgica D₁ pré-frontal está associada a disfunções cognitivas dos pacientes com esquizofrenia (Remy e Samson, 2003). Além disto, a diminuição na atividade da dopamina cortical pode contribuir para a desinibição subcortical dopaminérgica, já que a dopamina mesocortical tem efeito inibitório sobre a dopamina subcortical (Abi-Dargham et al, 2005).

A hipótese vigente de desbalanço dopaminérgico em esquizofrenia propõe que a condição está associada a uma persistente deficiência na função dopaminérgica pré-frontal, envolvendo receptores D₁, gerando os sintomas negativos e cognitivos e, um excesso intermitente na função dopaminérgica subcortical, envolvendo receptores D₂, que resultariam no estado psicótico. 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; Fredman 2003; Abi-Dargham e Laruelle, 2005; Buchanan e Carpenter, 2005; Winterer e Weinberger, 2004).

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 com estudos de PET (Soares e Innis, 1999; Abi-Dargham et al, 2000). Além disto, os bloqueadores D₂ são eficazes em reduzir os sintomas positivos, porém um número substancial de pacientes segue apresentando sintomas psicóticos como alucinações ou delírios (apesar de bloqueio D₂ adequado) e esses fármacos são menos eficazes na redução dos sintomas negativos e cognitivos. Por outro lado, essas medicações estão associadas a diversos efeitos colaterais, especialmente motores, relacionados ao bloqueio dopaminérgico na via nigroestriatal (sintomas extrapiramidais como distonia, acatisia e parkinsonismo), além de hiperprolactinemia associado ao bloqueio dopaminérgico tuberoinfundibular. Os sintomas extrapiramidais e o estado hipodopaminérgico associado a essas drogas, exacerbam os sintomas negativos e cognitivos. Sendo assim, o componente de desbalanço dopaminérgico parece ser uma das facetas da patofisiologia de um grupo de pacientes com esquizofrenia.

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; Domino et al, 2004). 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 muitos antipsicóticos são também antagonistas dos receptores 5-HT₂, sendo que a maioria dos antipsicóticos atípicos (como clozapina, olanzapina, quetiapina e risperidona) tem 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 na via nigroestriatal, o que preveniria 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; Domino et al, 2004).

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, foi encontrada uma redução do número de receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT₂A 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 glutamatérgico NMDA (Olney e Farber, 1995; Tamminga, 1998; Krystal et al, 1999; Goff, 2001; Heresco-Levy, 2003; Domino et al, 2004; Abi-Dargham e Laruelle, 2005). Mais tarde foi observado que outros antagonistas do receptor NMDA como a quetamina e dizolcipina (MK-801) também geravam um quadro clínico semelhante à esquizofrenia em sintomas positivos, negativos e cognitivos (Krystal et al, 1999; Heresco-Levy, 2003; Domino et al, 2004; Abi-Dargham e Laruelle, 2005). 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; Heresco-Levy, 2003; Domino et al, 2004; Abi-Dargham e Laruelle, 2005). 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 ação do glutamato é mediada por três tipos de receptores ionotrópicos (AMPA, cainato e NMDA) e duas famílias de receptores metabotrópicos. Cada receptor de glutamato é derivado de uma família de gens que codifica uma série de subunidades que, por sua vez, formam o receptor/canal permitindo uma ampla variedade de combinações com distintas propriedades, como afinidade ao glutamato e limiar para abertura do canal (Tamminga, 1998; Goff, 2001; Heresco-Levy, 2003). Receptores de NMDA são canais com estrutura e funcionamento complexos e abrem pela ação simultânea de voltagem e dois ligantes – glutamato e glicina. Além destes sítios de ligação, diversos fatores influenciam seu funcionamento como: sistemas de transportadores em neurônios e glia ou níveis de atividade AMPA e GABA-A. Assim, qualquer alteração sutil nos componentes da sinapse ou dos sítios de ligação pode ter um profundo impacto nas ações moduladas por esses receptores (Moghaddam, 2003; Goff, 2001).

A presença do glutamato é fundamental para a migração e crescimento neural, sinaptogênese, maturação das sinapses e a “poda” de sinapses supranumerárias por apoptose no cérebro em desenvolvimento ocorre na falta de glutamato (Heresco-Levy, 2003; Goff, 2001). Além de seu papel na citoarquitetura e conectividade neuronal, o glutamato também é mediador da excitotoxicidade neural que leva ao dano do sistema nervoso (Heresco-Levy, 2003; Tamminga, 1998; Goff, 2001). Assim, achados como migração neuronal aberrante, redução de conexões sinápticas e mesmo perda neuronal sem gliose - mecanismos

glutamatérgicos não induzem gliose proeminente (Olney e Farber, 1995; Tamminga, 1998) - em pacientes esquizofrênicos são compatíveis com disfunção em sistema glutamato (Goff, 2001).

Vias que estão implicadas na esquizofrenia como cortico-estriatal, tálamo-cortical e fibras de associação córtico-cortical utilizam glutamato como neurotransmissor. Mecanismos de controle recíprocos entre os sistemas glutamato e dopamina operam promovendo comunicação entre gânglios da base, tálamo e córtex modulando comportamento e cognição. Tanto um aumento da transmissão de dopamina como uma diminuição da transmissão de glutamato pode desencadear sintomas psicóticos, assim, tanto um agente que interfira na dopamina quanto em glutamato pode alterar a sensibilidade do sistema (Heresco-Levy, 2003; Moghaddam, 2003; Abi-Dargham e Laruelle, 2005).

A hipótese glutamatérgica, na versão de Olney e Farber (1995), ressalta o papel do glutamato como ativador dos receptores NMDA em neurônios GABAérgicos, que por sua vez mantêm um tônus inibitório sobre vias excitatórias glutamatérgicas que inervam outras áreas corticais e subcorticais, principalmente do sistema límbico. O bloqueio dos receptores NMDA deste circuito diminui a inibição GABAérgica sobre essas vias excitatórias, o que leva a uma hiperestimulação corticolímbica errática por perda do tono inibitório GABA. Deste modo, alterações primárias nos neurônios GABAérgicos, por exemplo, por um processo de autoexcitotoxicidade, seriam equivalentes ao estado de hipofunção NMDA. Um achado relevante neste aspecto é a diminuição de neurônios GABAérgicos no córtex cerebral de esquizofrênicos (Benes et al, 1991). 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, só é capaz de induzir sintomas psicóticos em adultos (Olney e Farber, 1995).

O estudo deste sistema em pacientes esquizofrênicos produziu resultados que deram origem tanto a hipóteses hipo (Olney e Farber 1995) como hiperglutamatérgicas (Deakin et al, 1989). 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). 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), 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. Desta forma, pode-se considerar que grande parte dos efeitos dos antagonistas NMDA seja decorrente desta liberação de glutamato, levando à hiperatividade dos receptores não-NMDA concomitantemente à hipofunção NMDA.

Achados como: anormalidades no número de receptores NMDA em região pré-frontal, redução de metabólitos e enzimas do sistema glutamatérgico em córtex frontal, temporal e hipocampo; redução da subunidade NR1 na composição de receptores NMDA em hipocampo; diminuição na expressão de RNAm de subunidades de receptores glutamatérgicos em tálamo de pacientes, são alguns

exemplos do provável envolvimento desse sistema em esquizofrenia (Goff, 2001; Buchanan e Carpenter, 2005).

Os modelos de psicose induzida por medicamentos são limitados, pois não expressam a complexidade de uma doença neurodesenvolvimental. Porém, os sintomas induzidos pelos antagonistas NMDA parecem um bom modelo, em especial quanto aos sintomas negativos e cognitivos, compatíveis com um diagnóstico de esquizofrenia desorganizada ou indiferenciada. Essas drogas parecem desencadear deficiências neuropsicológicas semelhantes às encontradas na esquizofrenia e os efeitos em sintomas negativos não são induzidos por sedação. Além disso, os efeitos persistem por mais tempo nos pacientes com esquizofrenia do que em voluntários normais (Goff, 2001; Domino et al, 2004). Assim, essas drogas servem como modelo farmacológico da doença em animais e passaram a fazer parte dos protocolos de desenvolvimentos de novos tratamentos antipsicóticos (Heresco-Levy, 2003).

A eficácia dos antipsicóticos em uso atualmente pode se dever, ao menos em parte, ao seu efeito sobre o sistema glutamato. Alguns estudos demonstraram que neurolépticos podem elevar os níveis de glutamato e aumentar a expressão de subunidades de receptores NMDA e não-NMDA de glutamato e aumentar seu *binding*. Outros sugerem que os antipsicóticos podem agir como agonistas parciais do sítio de glicina em concentrações terapêuticas. Pacientes tratados com clozapina apresentam concentrações séricas de glutamato maiores do que pacientes tratados com antipsicóticos convencionais. Além disto, os níveis séricos de glutamato e aspartato aumentam quando os pacientes trocam de antipsicóticos

convencionais para clozapina. A clozapina potencializa a neurotransmissão mediada por NMDA (Bressan et al,2005), reverte o comportamento de isolamento social induzido por PCP, altera padrões de liberação e recaptação de glutamato, altera as subunidades que compõe o receptor NMDA e é o antipsicótico mais potente em bloquear a neurotoxicidade induzida por antagonistas NMDA (Heresco-Levy, 2003).

Baseado nestas observações, pesquisas de agentes que modulem a transmissão NMDA vêm sendo feitas para o tratamento de esquizofrenia. Como agonistas diretos dos receptores NMDA podem levar à excitotoxicidade, as drogas pesquisadas atuam como: agonistas no sítio de reconhecimento da glicina (glicina, D-serina e D-cicloserina), inibidores do transportador de glicina (sarcosina) ou moduladores da liberação de glutamato (lamotrigina). Essas drogas foram avaliadas em ensaios clínicos como agentes potencializadores de antipsicóticos (Tabela 1).

A glicina quando acrescentada aos antipsicóticos típicos reduziu significativamente sintomas negativos, tendo reduzido também sintomas positivos e cognitivos, porém com menor impacto. No entanto, por penetrar pouco a barreira hematoencefálica (BHE) as doses eficazes foram altas, em torno de 60 gramas ao dia, o que dificulta seu uso. A D-serina que age como agonista do sítio da glicina teve efeito semelhante. A D-cicloserina é um agente tuberculostático, que cruza facilmente a BHE, e age como agonista parcial do sítio de glicina. Seu efeito foi compatível com seu perfil farmacológico. Quando acrescentada ao antipsicótico típico em doses baixas (+/- 30mg/dia) foi ineficaz, em doses de 50mg/dia melhorou sintomas negativos e em doses altas (>100mg/dia), agindo como antagonista

glicinérgico, piorou os sintomas positivos. A D-cicloserina não teve efeito quando dado junto com clozapina e seu efeito foi menor do que dos outros agentes. Do ponto de vista de efeitos colaterais essas medicações não induzem efeitos extrapiramidais e não há evidências de indução de neurotoxicidade.

Tabela 1. Resposta aos agentes glutamatérgicos em estudos de potencialização de antipsicóticos ^a

Estudo	Adjuvante	Antipsicótico	N	Duração (semanas)	Resposta (%) [*]		
					Sint +	Sint -	Cogn
Heresco-Levy (99)	GLI 60g	Típico	22	6	- 12	-30	-16
Tsai (98)	DSR 30mg/kg	Típico	31	6	- 17	-21	-12
Goff (95)	DCS 50mg	Típico	9	8	NS**	-21	NS
Goff (95a)	DCS 50mg	Típico	47	8	NS	-23	NS
Heresco-Levy (02a)	DCS 50mg	Típico	8	6	NS	-17	NS
Heresco-Levy (02b)	GLI 60g	Risp, Olanz	17	6	-11	-23	-9
Heresco-Levy (01)	DSR 30mg/kg	Risp, Olanz	23	6	-8,5	-12	-8
Evins (02)	DCS 50mg	Risp	10	8	NS	-10	NS
Heresco-Levy (02a)	DCS 50mg	Risp, Olanz	8	6	NS	-12	NS
Evins (00)	GLI 60g	Clozapina	30	8	NS	NS	NS
Diaz (01)	GLI 60g	Clozapina	12	14	NS	NS	NS
Tsai (99)	DSR 30mg/kg	Clozapina	20	6	NS	NS	NS
Goff (96)	DCS 50mg	Clozapina	10	8	NS	+21	NS
Goff (96b)	DCS 50mg	Clozapina	11	13	NS	+ 13,5	NS
Tsai (04)	Sarcosina 2g	Típico/Atípico	38	6	-17	-14	-13

^a Adaptado de: Heresco-Levy U. Glutamatergic neurotransmission modulation and the mechanism of antipsychotic atypicality Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry 2003; 27:1113-23.

* Expresso em porcentagem média de mudança nos escores da escala PANSS.** Não significativo estatisticamente

Outra estratégia de potencialização da transmissão glutamatérgica tem sido pela inibição do transportado de glicina tipo 1 (GLiT-1), visando aumentar os níveis sinápticos de glicina. A sarcosina, um aminoácido natural, inibe o GLiT-1 e em estudos comportamentais inibiu a hiperatividade induzida por PCP em doses correlacionadas com essa inibição. Em um ensaio clínico de potencialização de risperidona os pacientes apresentaram melhora dos sintomas positivos, negativos e cognitivos, sem indução de efeitos colaterais significativos (Tsai, 2004).

A lamotrigina, um anticonvulsivante que entre outras ações inibe a liberação de glutamato, foi capaz de atenuar os efeitos neuropsiquiátricos da quetamina (Anand et al, 2000). Em estudo realizado com pacientes esquizofrênicos em uso de clozapina a potencialização com lamotrigina melhorou sintomas positivos e de psicopatologia geral, sem melhora em sintomas negativos (Tiihonen et al, 2003). O topiramato, um antagonista glutamatérgico AMPA, usado como potencializador de antipsicóticos de segunda geração, incluindo clozapina, melhorou a sintomatologia geral avaliada pela PANSS (Tiihonen et al, 2005), mas não foi eficaz para sintomas positivos e negativos. Deste modo, drogas que modulam sistema glutamatérgico são novo alvo potencial no tratamento de pacientes com esquizofrenia.

Tratamento Farmacológico da Esquizofrenia e Refratariedade

A introdução da clorpromazina na década de 1950 iniciou uma nova era no tratamento da esquizofrenia. Foi a primeira medicação eficaz para tratar os sintomas da doença, a partir da qual foram desenvolvidas diversas drogas baseadas no mecanismo de bloqueio D₂. Esse mecanismo foi descoberto por estar subjacente aos efeitos extrapiramidais por ela induzidos. Apesar de sua eficácia

em controlar sintomas psicóticos agudos e aumentar o intervalo entre as crises, os antipsicóticos de primeira geração ou neurolépticos, no entanto, não são eficazes no tratamento dos sintomas negativos e apresentam diversos efeitos colaterais, incluindo os efeitos extrapiramidais, que limitam sua tolerabilidade e adesão dos pacientes ao tratamento (Buchanan e Carpenter, 2005). Além disso, essas drogas são pouco eficazes para um número significativo de pacientes e ineficazes para em torno de 20 à 40% dos casos - casos refratários (Hellewell, 1999). A clozapina, que surgiu na década de 1970, demonstrou eficácia superior às drogas até então conhecidas. Além de melhorar os sintomas negativos e cognitivos da doença, se mostrou eficaz em reduzir os sintomas em parte dos pacientes refratários às demais medicações. O surgimento dos antipsicóticos de segunda geração, a partir dos anos 80 do século XX, trouxe avanços na tolerabilidade e controle da sintomatologia (Buchanan e Carpenter, 2005). Porém, mesmo com a melhora clínica e na qualidade de vida de muitos pacientes, as drogas antipsicóticas não são específicas, não alteram o curso da doença e seguem trazendo poucos benefícios para os pacientes refratários.

A combinação de mais de um antipsicótico (Conley et al, 2005; Lerner et al, 2005), incluindo clozapina (Josiassen et al, 2005; Citrome et al, 2002; Buckley et al, 2001), e a potencialização dos antipsicóticos com drogas com outros perfis farmacológicos têm sido as estratégias mais estudadas para o tratamento destes casos (Buchanan e Carpenter, 2005; Stern 1997). Além da potencialização com agentes glutamatérgicos já referidos, que parece ter efeito significativo principalmente nos sintomas negativos, também o tratamento adjuvante com dehydroepiandrosterona (DHEA) mostrou-se eficaz em tratar a sintomatologia negativa (Strauss RD, 2005). Porém diversas outras drogas utilizadas, como

carbamazepina (Hesslinger et al, 1999; Neppe, 1988), deprenil (Jungerman et al, 1999), valproato (Citrome et al, 2003, Hesslinger et al, 1999), setralina (Lee et al, 1998), lítio (Schulz et al, 1999), e benzodiazepínicos (Wolkowitz et al, 1992) apresentaram resposta pobre ou duvidosa. Assim sendo, o tratamento da esquizofrenia, em especial dos casos refratários segue um desafio para clínicos e pesquisadores. Hipótese Adenosinérgica

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. Por ser o tema principal desta tese o sistema purinérgico e a adenosina serão descritas a seguir.

Sistema Purinérgico:

O sistema purinérgico é constituído pelos nucleotídeos da adenina ATP, ADP e AMP e o nucleosídeo adenosina (Figura 1). Além de sua reconhecida função no metabolismo energético das células, essas substâncias participam de importantes funções de sinalização intra e extracelular no sistema nervoso central como neurotransmissão, neuromodulação e neuroproteção (Fredholm et al. 2005; Dunwiddie e Masino, 2001; Cunha, 2001).

O ATP é estocado em vesículas e age como neurotransmissor excitatório por ação nos receptores ionotrópicos P2X e metabotrópicos P2Y (Brundege e Dunwiddie, 1997; Dunwiddie e Masino, 2001). A adenosina seria o componente purinérgico que regula muitos processos fisiológicos, especialmente, em tecidos excitáveis como coração e cérebro. Uma das ações fundamentais da adenosina é reduzir a atividade dos tecidos excitáveis ou aumentar a liberação de substrato

metabólico, de modo a adequar uso e aporte de energia. No SNC, que expressa grandes quantidades de receptores, a adenosina parece também estar envolvida em diversos processos fisiológicos e patológicos como neuromodulação, regulação do sono, neuroproteção e epilepsia (Fredholm et al. 2005; Dunwiddie e Masino, 2001).

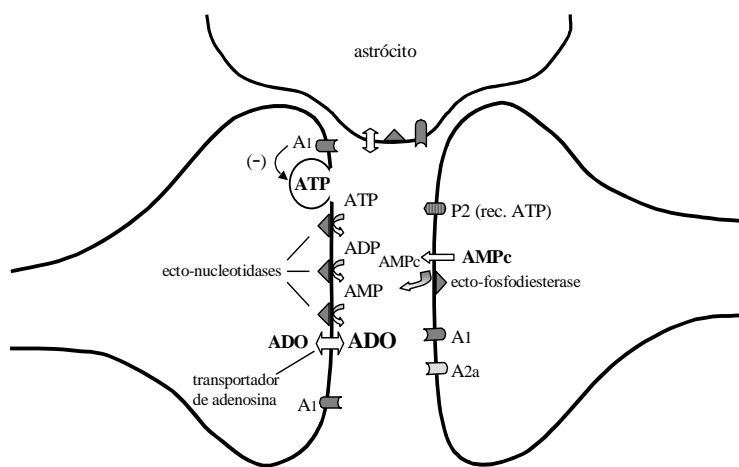


Figura 1. Sistema purinérgico e fontes de adenosina (ADO) extracelular (ATP, adenosina intracelular e AMPc).

Funções da Adenosina

No sistema nervoso central a adenosina desempenha diversas funções fisiológicas como a promoção e manutenção do sono, adequação da circulação

sangüínea à demanda energética das células e modulação da excitabilidade neural (neuromodulação), e também desempenha a função de neuroproteção em situações patológicas como hipóxia e isquemia (Fredholm et al. 2005; Brundege e Dunwiddie, 1997; Dunwiddie e Masino, 2001).

O papel da adenosina na regulação sono-vigília foi determinado a partir da observação de que antagonistas dos receptores de adenosina como cafeína promovem o estado de alerta e alteram o sono normal. Medidas diretas dos níveis de adenosina em gatos demonstraram que os níveis de adenosina aumentavam durante a vigília prolongada e diminuía no sono subsequente (Porkka-Heiskanen T. et al. 2002). Além disso, agonistas promovem o sono, enquanto antagonistas diminuem o sono. A adenosina inibe a atividade neural dos núcleos colinérgicos envolvidos em regular a vigília (Fredholm et al. 2005; Dunwiddie e Masino, 2001, Fredholm et al 1999).

A regulação da circulação cerebral é mediada por adenosina. Ela modula a resistência vascular através dos receptores A_{2A} , sendo responsável por manter o tônus da musculatura vascular. Assim, qualquer estímulo que promova sua liberação induz vasodilatação cerebral (Fredholm et al. 2005; Dunwiddie e Masino, 2001).

O efeito neuroprotetor da adenosina é estimulado por numerosas condições que inibam o metabolismo celular e aumentem a adenosina extracelular como: hipóxia, isquemia, estimulação elétrica ou química e ativação dos receptores NMDA (Fredholm et al. 2005; Brundege e Dunwinddie, 1997).

Em situações de desbalanço energético, a formação de adenosina pela degradação do ATP sinaliza as células vizinhas sobre o estresse metabólico. Embora as mudanças no ATP pudessem teoricamente ser o sinal de alterações energéticas, isso não ocorre porque a concentração intracelular do ATP é tão rigidamente

controlada que só se altera em situações de profundo desbalanço metabólico. Então a reação de adenilato quinase transforma mínimas alterações na concentração de ATP em grande aumento do AMP. O AMP faz o sinal intracelular, porém não atravessa as membranas para sinalizar às células vizinhas (Cunha, 2001).

A existência de um ciclo de substrato entre AMP e adenosina com atividades opostas da 5'-nucleotidase e adenosina quinase é outro passo de formação de adenosina intracelular quando há do aumento do AMP. A adenosina, então, pode sair da célula através do transportador bidirecional não concentrador que equilibra as concentrações de adenosina intra e extracelular (Cunha, 2001). Esse caminho enzimático converte mínimas alterações na concentração de ATP em aumentos desproporcionalmente grandes de adenosina extracelular. Vários estudos confirmaram o aumento da concentração extracelular de adenosina em situações de estresse metabólico. O papel da adenosina em sinalizar a diminuição do metabolismo intracelular em situações de estresse celular fez com que ela fosse chamada de “metabólito retaliatório” (Fredholm et al 2005 ;Cunha, 2001; Brundage e Dunwinddie, 1997).

Como em todas as células, também nos neurônios a homeostase é mantida utilizando como sinalizador o metabólito retaliatório adenosina em situações como: hipóxia, hipoglicemia, danos isquêmicos, envenenamento metabólico, convulsões, indução de radicais livres, agonistas ionotrópicos dos receptores de glutamato e modulação do ácido aracdônico. O alvo final da homeostase no neurônio é o controle da atividade dos canais iônicos que são controlados em última análise pela taxa metabólica (Cunha, 2001).

O papel neuromodulatório da adenosina se dá em situações fisiológicas pela modulação da liberação de neurotransmissores e resposta pós-sináptica. A ação

inibitória no SNC predomina e resulta da ação pré-sináptica via A_1 nos sistemas dopaminérgico, serotoninérgico, glutamatérgico, colinérgico, noradrenérgico e GABAérgico (Fredholm et al 2005; Cunha, 2001; Brundage e Dunwiddie, 1997).

O efeito dos receptores A_1 é mediado por uma combinação de hiperpolarização pós-sináptica por ativação da condutância de potássio e uma inibição pré-sináptica da liberação de neurotransmissores. A ação pós-sináptica A_1 é indistinguível farmacologicamente da ação pré-sináptica inibitória. A inibição mediada por A_1 na liberação de neurotransmissores independe do efeito nos níveis de AMPc, mas da inibição direta via proteína G nos canais de cálcio tipo N. O papel dos receptores A_{2A} é mais relevante nas áreas ricas em dopamina onde exerce neuromodulação antagônica das sinapses dopaminérgicas. O alvo final do receptor A_{2A} na modulação da liberação de neurotransmissores parece ser os canais de cálcio tipo P (Fredholm et al. 2005; Dunwiddie e Masino, 2001).

O papel neuromodulatório da adenosina não parece ser a base da neuroproteção, pois uma despolarização persistente se inicia alguns minutos após o início da anóxia devido a queda de energia neuronal. A neuroproteção ocorre no intervalo de horas enquanto a neuromodulação se dá no intervalo de milissegundos a minutos. A neuroproteção está relacionada à capacidade da adenosina em afetar o metabolismo celular (Fredholm et al 2005; Cunha, 2001).

Consistentemente com seu efeito neuromodulador inibitório, a adenosina demonstrou efeito anticonvulsivante em modelos experimentais de epilepsia. Agonistas dos receptores de adenosina têm efeitos anticonvulsivantes e antagonistas efeito pró-convulsivante. Como os níveis endógenos de adenosina aumentam muito durante as crise convulsivas, foi proposto que ela funcione como um anticonvulsivante endógeno (During e Spencer, 1992). O efeito anticonvulsivante

parece ser mediado primariamente pelos receptores A_1 . A perda do t nus inibitório adenosin rgico pode contribuir para a hiperexcitabilidade e convulsões recorrentes características da epilepsia. No entanto, agonistas de adenosina não demonstraram ser clinicamente úteis devidos aos efeitos periféricos cardiovasculares.

Metabolismo da Adenosina

Existem duas vias principais de forma o de adenosina intracelular: a clivagem de S-adenosilhemociste na (SAH) pela S-adenosilhemociste na hidrolase (SAHH) e a degrada o dos nucleotídeos de adenina a 5'-AMP e então   adenosina (Fredholm et al. 2005; Brundege e Dunwinddie, 1997)(figura 2).

A rea o catalisada pela SAHH   reversível podendo formar tanto adenosina e homocisteína como utilizar adenosina na síntese de SAH. A SAHH está presente em níveis mais altos nos neurônios do que em glia. No entanto, não parece estar relacionada   libera o de adenosina, mas aos níveis basais de adenosina em certas áreas cerebrais (Fredholm et al. 2005; Brundege e Dunwinddie, 1997).

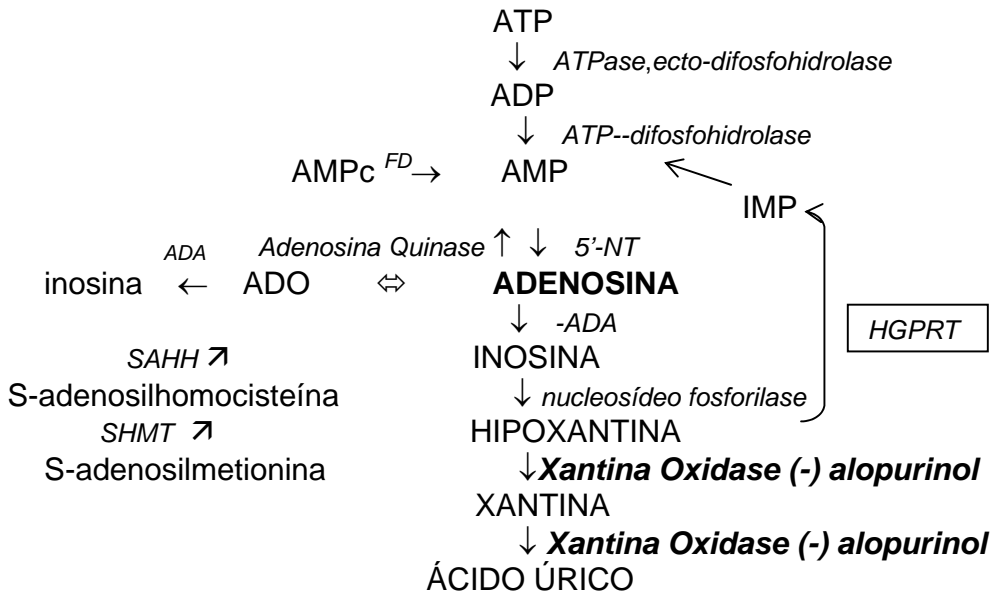


Figura 2 : Metabolismo da Adenosina.

SHMT – serina hidroximetiltransferase; *SAHH* – S-adenosilhomocisteína hidrolase; *FD* – fosfodiesterase; *ADA* – adenosina deaminase; *HGPRT* – Hipoxantina-guanina-fosforibosil tranferase, *5'-NT* - 5' nucleotidase, ADO - Adenosina

A adenosina pode ser formada pelo metabolismo de nucleotídeos intracelulares. Dentro da célula as concentrações de adenosina são normalmente extremamente baixas (níveis nanomolares) e a adenosina é mantida em equilíbrio com os nucleotídeos de adenina. A maior parte dos nucleotídeos de adenina intracelular está na forma de ATP (na faixa milimolar baixa). O ATP está sendo constantemente defosforilado à ADP por uma grande gama de ATPases durante as reações que requerem energia. O ADP pode ser refosforilado pela creatina quinase ou por fosforilação oxidativa na mitocôndria, ou ainda, formar ATP e AMP transferindo o fosfato de um ADP a outro pela ação da adenilato quinase. O AMP por sua vez pode ser defosforilado à adenosina pela ação da 5'-nucleotidase (5'NT) (Brundege e Dunwinddie, 1997).

Em nível extracelular, muitos tipos celulares e presumivelmente todos os tecidos têm a capacidade de metabolizar nucleotídeos e nucleosídeos por enzimas extracelulares de superfície. A degradação dos nucleotídeos que foram liberados como substâncias sinalizadoras, durante processos patológicos ou fisiológicos, é uma importante fonte de adenosina extracelular (Zimmermann, 1996; Zimmermann et al, 1998). As enzimas que metabolizam os nucleotídeos no espaço extracelular são as mesmas que no interior das células.

Uma vez sintetizada a adenosina pode difundir-se através da membrana por difusão facilitada pelo transportador bidirecional de nucleosídeos, que é gradiente dependente (Fredholm et al. 2005; Brundege e Dunwinddie, 1997).

A adenosina formada pode ser metabolizada em duas rotas: refosforilação à AMP pela adenosina quinase (AQ) ou deaminação em inosina pela enzima

adenosina deaminase (ADA). A metabolização da adenosina se dá principalmente em nível intracelular e induz a sua captação para o meio intracelular pelo transportador. Isso foi evidenciado por estudos que demonstraram que a inibição da AQ leva a um aumento quase imediato dos níveis intracelulares de adenosina, enquanto a inibição do transportador leva a um aumento gradual da concentração ao longo de uma hora. O estado energético da célula e a atividade da 5'NT e da AQ são os fatores principais que controlam a metabolização da adenosina. 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 (o Km da ADA é em torno de 10 vezes maior que AQ) (Fredholm et al. 2005; Brundege e Dunwinddie, 1997).

A adenosina deaminada pela ADA à inosina é transformada em hipoxantina pela enzima nucleosídeo fosforilase. A hipoxantina é metabolizada em xantina e ácido úrico pela ação da enzima xantina oxidase (XO). A hipoxantina pode ser novamente transformada em IMP (precursora de AMP) pela ação da enzima hipoxantina-guanina fosforibosil transferase (HGPRT) responsável pela via de salvamento de purinas. A via de salvamento visa preservar o montante de purinas no organismo. Ela parece ser relevante, em especial para o cérebro, pois a deficiência na enzima HGPRT causa a síndrome Lesch-Nyhan caracterizada por graves sintomas neuropsiquiátricos. Os pacientes portadores da síndrome completa possuem séria deficiência na atividade da enzima e sintomas de retardo mental, comportamento compulsivo e de automutilação, além de espasticidade, movimentos coreiformes, hiperuricemia e gota (Roberts 2001; Moriwaki, 1999).

A adenosina não é um neurotransmissor uma vez que não é estocada em vesículas, não parece ser liberada por Ca^{2+} de forma clássica, nem parece haver

sinapses primariamente adenosinérgicas (Fredholm et al. 2005; Dunwiddie e Masino, 2001). A adenosina pode ser formada tanto nos espaços intra e extracelular. A adenosina formada em ambos os locais é importante para a manutenção dos níveis extracelulares e, portanto, modula a capacidade de interagir com os receptores e exercer seus efeitos (Zimmerman, 1996).

Existem duas formas de transporte de adenosina através da membrana celular. O transporte passivo equilibra as concentrações e tende a ter fluxo em direção intracelular, uma vez que a adenosina quinase mantém os níveis de adenosina intracelular baixos. Há também um transporte ativo que depende do gradiente de Na⁺ para prover energia. No entanto, esse transporte ainda não está bem caracterizado. É possível que ele também sirva para liberar adenosina quando os níveis intracelulares estiverem altos e os gradientes de Na⁺ baixos, como em hipóxia, isquemia e epilepsia (Fredholm et al. 2005; Dunwiddie e Masino, 2001).

A liberação de adenosina pelo transportador bidirecional é a principal fonte de adenosina nas células em estresse metabólico. Esse tipo de liberação também foi preconizado em nível sináptico, porém seria contrário ao gradiente de concentração e o transportador é bidirecional, e não concentrador (Fredholm et al. 2005; Cunha, 2001).

Em nível sináptico a principal fonte de adenosina parece ser pelo catabolismo do ATP liberado na fenda. As ecto-enzimas estão presentes na proximidade dos receptores A₁ inibitórios pré-sinápticos e são rápidas em sua ação. Mesmo análogos estáveis do ATP podem ser substratos para essas nucleotidases (Dunwiddie e Masino, 2001).

A ecto-5'nucleotidase é o passo limitante na formação de adenosina por inibição pelo ATP e ADP. Quando a liberação de ATP é baixa há uma formação linear de adenosina. Quando a liberação de ATP é alta, o AMP se acumula no meio extracelular e apenas quando os níveis de ATP e ADP caem abaixo do limiar de inibição da ecto-5'nucleotidase é que a adenosina será formada de forma 'explosiva' (Cunha, 2001).

Receptores de Adenosina:

A adenosina exerce suas funções pela ativação dos receptores P1 que são subdivididos em A_1 , A_{2A} , A_{2B} e A_3 (Tabela 2).

Os receptores A_1 são os mais abundantes no SNC. São acoplados a proteínas G e podem inibir a atividade da adenilil ciclase e a formação de AMPc. Os receptores A_1 podem diminuir a excitabilidade neuronal tendo efeitos inibitórios pré-sinápticos em vários neurotransmissores como dopamina, serotonina, glutamato e acetilcolina (Fredholm et al. 2005; Brundage e Dunwiddie, 1997). Os possíveis mecanismos de inibição da liberação de neurotransmissores são a ativação de canais de potássio (K^+) e inibição de canais de cálcio (Ca^{2+}). Ambas ações levam a uma inibição da atividade neural (Fredholm et al. 2005; Dunwiddie e Masino, 2001).

Os receptores A_2 são expressos em altos níveis apenas em algumas regiões do cérebro. Exercem efeitos opostos aos receptores A_1 , estimulando a atividade da adenilil ciclase e aumentando a formação de AMPc via ativação de proteínas G do subtipo $G\alpha$. Os receptores A_2 se subdividem em A_{2A} e A_{2B} em função de afinidades por agonistas (Fredholm et al. 2005; Brundage e Dunwiddie, 1997; Dunwiddie e Masino, 2001).

O receptor A_{2A} tem alta afinidade por adenosina e estão concentrados em áreas ricas em dopamina como caudado-putamen, núcleo accumbens e tubérculo olfatório (Fredholm et al. 2005; Brundege e Dunwiddie, 1997; Dunwiddie e Masino, 2001; Linden, 1999). Assim a ação primária de A_{2A} é atuar sobre a atividade de dopamina e outros neurotransmissores em áreas ricas em dopamina, modulando a atividade sináptica através de interação antagônica com dopamina (Fredholm et al. 2005; Ferré, 1997; Brundege e Dunwinddie, 1997).

Os receptores A_{2B} estão menos bem caracterizados, mas parecem mediar aumentos de AMPc na presença de altas concentrações de adenosina. Baseado no fato destes receptores interagirem com mediadores inflamatórios e em sua baixa potência, postula-se que esses receptores tenham um papel na neuroproteção quando os níveis de adenosina estiverem altos. Os receptores A_3 ainda não são bem conhecidos, mas parecem interagir com os receptores A_1 (Brundege e Dunwinddie, 1997).

Do ponto de vista farmacológico tem sido muito difícil desenvolver drogas tecido-específicas para interagirem com os receptores de adenosina. Drogas altamente seletivas para A_1 não são capazes de distinguir receptores cardíacos ou cerebrais e diminuem tanto o ritmo cardíaco quanto à atividade neural. Embora possa haver diferenças em acoplamento de proteína G e transdução de sinal entre os receptores de diferentes regiões, há poucas diferenças que possam ser exploradas farmacologicamente (Dunwiddie e Masino, 2001).

Tabela 2: Receptores de adenosina no cérebro

Receptor	Afinidade	Proteína-G	Efetores	Resposta Funcional
A ₁	~ 70nM	Gi e Go	(-) adenilil ciclase (+) GIRKs (-) canais de Ca ²⁺ (+) PLC	(-) transmis. sináptica hiperpol. neurônios
A _{2A}	~ 150nM	Gs e Golf	(+) adenilil ciclase (-) canais de Ca ²⁺ (+) canais de Ca ²⁺ (?)	(+) liber. transmissores (-) liber. transmissores
A _{2B}	~5100nM	Gs	(+) adenilil ciclase (+) PLC	aumenta AMPc modula canais Ca ²⁺
A ₃	~6500nM	Gi e Gq	(+) PLC (-) adenilil ciclase ↑ Ca ²⁺ intracelular	desacolpa A1 e mGlu

Alopurinol

O alopurinol (4-hidroxipiridazole-[3,4-d] pirimidina) é um inibidor da enzima xantina oxidase, que atua nos passos finais da degradação de purinas e catalisa sua transformação em ácido úrico (Figura 2). Ele é um potente inibidor competitivo em baixas concentrações e em altas concentrações também é um substrato para enzima (Roberts 2001). A ação do alopurinol promove uma importante diminuição na produção de ácido úrico com marcada redução em seus níveis plasmáticos e urinários. Em função deste efeito e de ser droga bem tolerada é usada desde a década de 70 em pacientes com hiperuricemia e gota e foi um dos primeiros exemplos de um fármaco desenvolvido a partir do conhecimento da patofisiologia de uma doença (Roberts 2001).

A absorção da droga ingerida é rápida, em torno de 30 a 60 minutos, atingindo o equilíbrio em torno de 2 a 6 horas. A distribuição se dá em todos tecidos, porém no cérebro sua concentração é em torno da metade dos demais tecidos do organismo. O alopurinol é eliminado por conversão à aloxantina (oxipurinol) e excretado pelo rim. O metabólito oxipurinol ou aloxantina é um inibidor não competitivo da xantina oxidase e menos potente que o alopurinol. A excreção da droga inalterada em 24 horas é em torno de 10% enquanto que 50% é eliminado sob forma de oxipurinol. O efeito de uma dose de 600mg, aferido pelo efeito inibitório sobre a xantina oxidase, não é mais observável após 24 horas (Roberts 2001).

As doses usuais para tratamento de gota são em torno de 200 a 300 mg por dia divididas em duas tomadas, em casos mais graves pode-se aumentar a dose para 400 à 600 e raramente chegar a doses de 800 à 1000mg. Não há desenvolvimento de tolerância (Roberts 2001).

O alopurinol é uma droga bem tolerada e não há evidências de efeitos tóxicos no organismo decorrentes da inibição da xantina oxidase. A maioria dos efeitos indesejáveis é leve, sem gravidade e desaparecem poucos dias após a descontinuação. Os efeitos secundários mais comuns são cefaléia, tontura, náusea, vômitos, vertigem, diarreia e irritação gástrica que raramente requerem a descontinuação do tratamento. Os sintomas cutâneos como prurido, eritema e erupção macopapular, ocasionalmente lesões exfoliativas, urticariformes ou purpúricas, ocorrem em torno de 3% dos pacientes e podem levar a descontinuação da droga. Mais raramente pode ocorrer leucopenia ou leucocitose, hepatomegalia, elevação das transaminases, e relatos isolados de neurite periférica, depressão medular e catarata (Roberts 2001).

O alopurinol também é usado como agente hipouricemiante na síndrome de Lesch-Nyhan (Roberts 2001; O'Regan et al, 1989). Como já descrito, os pacientes portadores desta síndrome apresentam deficiência na atividade da enzima HGPRT da via de salvamento de purinas. Nestes pacientes o alopurinol melhora os efeitos da hiperuricemia. No entanto, não afeta os sintomas neurológicos progressivos da síndrome, pois a deficiência enzimática impede a utilização da hipoxantina acumulada pela via de salvamento.

Em pessoas normais a via de salvamento é essencial para o metabolismo das purinas no sistema nervoso. Com o uso de alopurinol a hipoxantina acumulada em decorrência do bloqueio da xantina oxidase poderá ser convertida a nucleotídeo (IMP) pela ação da HGPRT (O'Regan et al, 1989). Esse mecanismo de aumento do *pool* de purinas vem sendo postulado como possivelmente envolvido no efeito

terapêutico do alopurinol em epilepsia refratária em função da adenosina ser um anticonvulsivante endógeno (Tada et al, 1991; Zagnoni et al, 1994).

Além disso, o alopurinol foi estudado por nosso grupo para o tratamento de pacientes com agressividade refratária. Foram relatados os casos de dois pacientes com melhora dramática da agressividade com uso de alopurinol 300mg/dia e uma série de 6 pacientes com demência e agressividade não responsiva às estratégias farmacológicas anteriores, dos quais 5 responderam positivamente à introdução de alopurinol 300-600mg/dia (Lara et al, 2000; Lara et al, 2003). O alopurinol também mostrou-se eficaz no tratamento de mania refratária em 2 pacientes que apresentavam hiperuricemia (Machado-Vieria et al 2001)

Em 2001, foi relatada por nosso grupo, uma série de casos de tratamento de potencialização de antipsicóticos com alopurinol em pacientes portadores de esquizofrenia refratária. Dos 11 pacientes tratados: 5 apresentaram resposta clínica relevante, 2 resposta discreta e 4 não apresentam resposta, sendo que foram descritos em detalhe os casos de 2 pacientes com resposta clinicamente significativa (Lara et al, 2001).

Objetivos:

Objetivo Geral:

Aprofundar o estudo da hipótese de hipofunção adenosinérgica em esquizofrenia

Objetivos específicos:

1. Revisar e atualizar a hipótese de hipofunção adenosinérgica em esquizofrenia a partir de revisão analítica da literatura recente;
2. Baseado na hipótese de hipofunção adenosinérgica: avaliar os resultados do tratamento adjuvante com alopurinol em pacientes esquizofrênicos refratários à medicação usual em um ensaio clínico randomizado, duplo-cego, cruzado.

Parte II

Capítulo 1

INVOLVEMENT OF ADENOSINE IN THE NEUROBIOLOGY OF SCHIZOPHRENIA AND ITS THERAPEUTIC IMPLICATIONS

Status: submetido à revista

**Progress in neuro-psychopharmacology & biological
psychiatry**

INVOLVEMENT OF ADENOSINE IN THE NEUROBIOLOGY OF SCHIZOPHRENIA AND ITS THERAPEUTIC IMPLICATIONS

**Diogo R. Lara^{1,2CA}, Oscar P. Dall'Igna³, Eduardo S. Ghisolfi^{1,3}, Miriam G.
Brunstein³**

1. Departamento de Ciências Fisiológicas, Faculdade de Biociências, PUCRS, Porto Alegre, Brazil
2. Departamento de Psiquiatria, Faculdade de Medicina, PUCRS, Porto Alegre, Brazil
3. Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS, Porto Alegre, Brazil

Corresponding Author (CA):

Diogo R. Lara, M.D. Ph.D.

Faculdade de Biociências, PUCRS

Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 12 A

Caixa Postal 1429

Porto Alegre – RS – Brazil

90619-900

Fax No.: 55 51 3320 3612

E-mail: drlara@pucrs.br

Abstract

Based on the neuromodulatory and homeostatic actions of adenosine, it is suggested that adenosine dysfunction may contribute for some neurobiological and clinical features of schizophrenia. This model takes into consideration the dopamine and glutamate hypotheses, since adenosine exerts neuromodulatory roles on these systems, and proposes that adenosine, perhaps more than GABA, mediates the inhibitory deficit found in schizophrenia. Given the role of adenosine activation of A1R in mediating neurotoxicity in early stages of brain development, pre- and peri-natal complications leading to excessive adenosine release would induce primary brain changes (first hit). These events would lead to an adenosine inhibitory deficit through a partial loss of A1R that may emerge as a reduced control of dopamine activity and increased vulnerability to excitotoxic glutamate action in the mature brain (second hit). Adenosine dysfunction is reasonably compatible with symptoms, gray and white matter abnormalities, progressive brain loss, pre- and perinatal risk factors, age of onset, response to current treatments, impaired sensory gating and increased smoking in schizophrenia. Pharmacological treatments enhancing adenosine activity, especially through A1 receptors, could be effective for symptom control and for alleviating deterioration in the course of the illness. Accordingly, allopurinol, which may indirectly increase adenosine, was effective and well-tolerated in the treatment of schizophrenia. Since much of the evidence for the adenosine hypothesis are circumstantial, further investigation in the field is warranted.

Key words: schizophrenia - adenosine - caffeine - glutamate – dopamine – neuroprotection – neurodevelopment - purinergic system.

Introduction

Despite the characterization of several disease processes and risk factors, the pathophysiology of schizophrenia remains puzzling. Even with correct treatment, as a rule, symptom control is only moderate and the course of the disease normally leads to long-lasting personal, cognitive and social deterioration. Based on the neuromodulatory activity of adenosine, here we further develop our hypothesis (Lara and Souza, 2000) suggesting that some aspects of the disease may be consistent with a deficit in adenosinergic activity and alterations in the purinergic system. We compare the actions and characteristics of adenosine in regard to several features of schizophrenia, suggest the basic mechanisms by which an adenosine hypofunction state could take place and report the few studies addressing the purinergic system in this disease.

Adenosine and the purinergic system

The purinergic system comprises two main effectors, namely the neuromodulator adenosine acting on A1, A2A, A2B and A3 receptors, and the nucleotide ATP, acting on P2X and P2Y receptors (Ralevic and Burnstock, 1998). In the human central nervous system (CNS), adenosine A1 receptors (A1R) are densely and heterogeneously expressed, being particularly abundant in basal ganglia, mediodorsal thalamus, temporal, frontal, parietal and occipital cortex, cingulate, hippocampus, and less concentrated in sensory-motor and insular cortex, lateral thalamus, cerebellum, midbrain and brain stem (Bauer et al., 2003). Adenosine A2A receptors (A2AR) are mostly found in the striatum, co-localized with dopamine D₂ receptors (D₂R) (Ferre, 1997), but lower expression can be found in other brain

regions. The roles of A2B and A3 receptors are less well established. They may only come into play in pathological situations where adenosine levels rise markedly because of their lower affinity for adenosine (Dunwiddie and Masino, 2001) and will not be considered further.

As shown in Figure 1, after ATP is released in the synaptic cleft from presynaptic vesicles, ecto-nucleotidases such as ecto-NTPDases and ecto-5'-nucleotidase promote nucleotide hydrolysis down to adenosine, integrating both purinergic subsystems (Zimmermann, 1996). This source of extracellular adenosine is important regarding its neuromodulatory roles (Cunha, 2001). Adenosine can then be uptaken by concentrative (uni-directional) or by equilibrative (bi-directional) nucleoside transporters. The latter also releases adenosine when its intracellular concentration is increased due to ATP depletion, in circumstances such as brain hypoxia or seizures (Dunwiddie and Masino, 2001). This is the source of extracellular adenosine to play its homeostatic or 'retaliatory' role (Cunha, 2001). Since ATP concentration in neural cells are around 3 mM and adenosine levels are within moderate to high nM range (~10,000 times lower than ATP), minor increases in ATP breakdown leads to a disproportional high production and release of adenosine in comparison to basal physiological levels (Cunha, 2001). Extracellular cAMP is another source of adenosine that can come into play less rapidly than extracellular breakdown from ATP or release of adenosine as such and may be more relevant as a source of adenosine in the nucleus accumbens (Dunwiddie and Masino, 2001). Adenosine can be further metabolized to inosine, hypoxanthine, xanthine and finally to uric acid by xanthine oxidase (Figure 2), or can be phosphorylated by adenosine kinase (Figure 1), which is the preferential route under physiological conditions (Dunwiddie and Masino, 2001).

A1R are among the most abundant and widely expressed inhibitory G protein-coupled receptors (G_i and G_o) in the brain (Rivkees et al., 1995). Activation of adenosine A1R inhibits the release of several neurotransmitters, such as glutamate, dopamine, serotonin and acetylcholine, and decreases neuronal activity by post-synaptic hyperpolarization (Dunwiddie and Masino, 2001). These neuromodulatory actions under physiological conditions can be separated from the role of adenosine as a homeostatic regulator of brain activity under stressful or pathophysiological conditions (Cunha, 2001), when adenosine formed from intracellular ATP breakdown is released to inhibit excitotoxic neuronal activity by glutamate. For this reason, adenosine is considered an endogenous anticonvulsant and neuroprotective agent. Accordingly, pre-clinical studies show that administration of A1R agonists exert anticonvulsant, neuroprotective, anxiolytic, sedative (Dunwiddie and Masino, 2001; Ralevic and Burnstock, 1998), antiaggressive (Ushijima et al., 1984) as well as antipsychotic-like actions (Ferre, 1997; Kafka and Corbett, 1996; Sills et al., 1999). A1R knockout mice display aggressiveness, anxiety, emotional instability, normal learning, greater susceptibility to hypoxia in adulthood and decreased survival rate (Gimenez-Llort et al., 2002; Johansson et al., 2001; Lang et al., 2003).

A2AR and D_2R are co-localized in GABAergic striatopallidal neurons and form functional heteromeric complexes, with opposing actions via coupling with G_{olf} and G_i proteins (Ferre, 1997; Hillion et al., 2002). Activation of A2AR decreases the affinity of D_2R for dopamine, without altering the affinity for D_2 receptor antagonists. D_2R and A2AR receptors have opposite effects on cAMP accumulation, regulation of DARPP-32, CREB phosphorylation and *c-fos* expression (Svenningsson and Fredholm, 2003). Pre-clinically, A2AR agonists exert antipsychotic-like and cataleptic effects, whereas antagonists increase locomotion and have anti-parkinsonian action

(Ferre, 1997). A2AR knockout mice present increased aggressiveness, anxiety and hypoalgesia (Ledent et al., 1997) and show reduced behavioral effects with amphetamine and cocaine administration (Chen et al., 2000).

The adenosine dysfunction hypothesis

Current neurotransmitter hypothesis of schizophrenia have emerged from pharmacological models, such as amphetamine and antipsychotics for the dopamine hypothesis and PCP for the glutamate hypothesis. In contrast, the present adenosine hypothesis is based on the neurobiological roles of adenosine. The arguments to support possible adenosine dysfunction in schizophrenia are summarized in Table 1, where features of schizophrenia and the physiological roles of adenosine are compared. The xanthines caffeine and theophylline are the closest pharmacological models of adenosine hypofunction in humans since they are non-selective antagonists of A1R and A2AR and their biological effects are attributed to this mechanism of action (Fredholm et al., 1999). In contrast to the intermittent and relatively weak blockade of adenosine receptors produced by low-dose caffeine intake normally observed in humans, schizophrenic patients would have a persistently decreased adenosinergic activity, probably by reduced A1R expression. Moreover, due to the relatively low potency of xanthines to block adenosine receptors (low micromolar range compared to a moderate nanomolar range of adenosine) (Dunwiddie and Masino, 2001; Fredholm et al., 1999), moderate doses of caffeine or theophylline are probably necessary to exert sufficient antagonism of adenosinergic activity in humans to produce relevant psychotropic effects.

Neurodevelopment, structural abnormalities, progressive brain loss and age of onset

Regarding the neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia, a disruption of normal brain development particularly from the second half of gestation to perhaps the first year of life can lead to circuitry alterations translated into behavioral and neurophysiological alterations that become more prominent from adolescence (Lewis and Levitt, 2002). Several mechanisms have been suggested, such as hypoxia and viral infections (Bullmore et al., 1997). Neuroimaging studies have repeatedly shown increased ventricles and brain size reductions already at the first psychotic episode (Shenton et al., 2001), and brain morphological alterations seem to be greatly influenced by environmental factors (Bullmore et al., 1997; Weisbrod et al., 2004).

All brain insults leading to ATP breakdown such as hypoxia, seizures, infections and trauma eventually increase extracellular adenosine levels (Cunha, 2001; Dunwiddie and Masino, 2001). Recent studies have shown that increased adenosine levels during early brain development may have important consequences. Turner et al. (2002b) have shown that administration of an A1R agonist in the early postnatal period leads to ventricular enlargement and diffuse gray and white matter alterations. The most prominent histopathological alteration was decreased axonal number and volume, which is accompanied by a ~50% reduction in A1R density. This was the first evidence for an *in vivo* neurotoxic effect of adenosine in the immature brain, which contrasts with its neuroprotective role in the mature brain. Also, neurite formation was inhibited by adenosine *in vitro* (Thevananther et al., 2001) and an A1R agonist administered in the early postnatal period produced mild neuronal death by apoptosis in the striatum and thalamus *in vivo* (Turner et al., 2002a). Of fundamental importance, *mice lacking the A1R were fully protected against the 3-fold increase in ventricular volume and white matter abnormalities resulting from hypoxia in the early*

postnatal period (Turner et al., 2003). Heterozygote mice for the A1R submitted to neonatal hypoxia presented halfway alterations compared to wild-type mice. Also, mice lacking adenosine deaminase, an enzyme involved in adenosine degradation, had 8-fold higher adenosine levels and ventricles increased two-fold (Turner et al., 2003). These results strongly suggest that, *in the immature brain, adenosine acting on A1R is both sufficient and necessary for hypoxia-induced neurotoxicity* instead of glutamate-induced excitotoxicity. The pre- or peri-natal toxic effect of adenosine could be triggered by any situation leading to energetic imbalance, ATP breakdown and consequent adenosine release. Considering the fine and time-specific process of early brain development, a certain degree of heterogeneity in the final phenotype is expected, since the consequences to the brain should vary according to when, how much and for how long an event leading to increased adenosine levels would take place.

The morphological brain alterations produced by early treatment with an A1R agonist in rats (Turner et al., 2002b) is increased ventricles, reduced hippocampus, cerebral cortex and corpus callosum as well as white matter alterations. Accordingly, MRI findings of schizophrenia have documented widespread gray and white matter changes (Davis et al., 2003; Shenton et al., 2001). Interestingly, adenosine neurotoxicity in the immature brain affects mostly axons, which is in line with findings in schizophrenia of increased neuronal density and reduced arborization (Davis et al., 2003).

Although the PET study (Bauer et al., 2003) showed low A1R signal in white matter structures, mice treated with the A1R agonist had prominent alterations in white matter and corpus callosum, and mice lacking A1R were protected from white matter changes induced by hypoxia (Turner et al., 2002b); (Turner et al., 2003).

Moreover, A1R have been identified in oligodendrocytes and myelin fractions (in contrast to A2AR) and modified microviscosity of myelin membranes and migration of oligodendrocytes (Casado et al., 1991; Othman et al., 2003). Thus, white matter changes, which have been increasingly implicated in altered neuronal connectivity and negative symptoms in schizophrenia, could also be related to early adenosine alterations (Davis et al., 2003).

Recent evidence suggest that, at least in selected cases, there is increased brain loss in schizophrenic patients (Gogtay et al., 2004; Lieberman et al., 2001; Shenton et al., 2001). Since lost neuropils due to adenosine neurotoxicity in early brain development are inhibitory, this could result in a relative predominance of glutamate excitatory activity due to an adenosine inhibitory deficit. The well documented role of adenosine as an endogenous neuroprotective agent as shown by worsening of brain lesions by A1R antagonists (Cunha, 2001; de Mendonca et al., 2000) and the increased susceptibility of A1R knockout mice to hypoxia *in the mature brain* indicate that reduced A1R-mediated adenosine activity may increase the vulnerability to brain damage by altering this balance between protective adenosine and excitotoxic glutamate actions in adulthood (Johansson et al., 2001). Also, A1R knockout mice showed worsened demyelination, axonal injury and worse neurological outcome in an animal model of cerebral inflammation (Tsutsui et al., 2004). Thus, the adenosine model suggests a single biochemical mechanism that is compatible with the proposed 'two-hit' model: disruption in early brain development and increased neurodegeneration during late brain maturation (Shenton et al., 2001).

The transition from the neurotoxic to the neuroprotective role of adenosine and the ontogeny of adenosine inhibitory function has been poorly characterized during the period from childhood to early adulthood. Nevertheless, children seem to

be less susceptible to the effects of caffeine than adults (Nehlig et al., 1992), and up to mid adolescence, people do not usually seek for caffeine. In general, such behavior gradually develops from late adolescence to early adulthood. In rats, caffeine stimulates locomotor activity in adults but not infants (Guillet, 1990). These changes in response to xanthines may relate from increase in density of both A1R and A2AR up to four weeks of age (Doriat et al., 1996; Johansson et al., 1997; Marangos et al., 1982), which is equivalent to early puberty in humans. Accordingly, the inhibitory *presynaptic* effects of adenosine on neurotransmitter release mediated by A1R become important only in mature synapses, i.e. from rats at least 4-5 weeks old (Dumas and Foster, 1998). Altogether, these findings may be correlated to the onset of schizophrenic symptoms at late adolescence and early adulthood if this is a phase when the inhibitory action of adenosine becomes more important. The sequence of events possibly linking adenosine dysfunction and schizophrenia from early development to adulthood is depicted in Figure 3.

Adenosine and the dopamine hypothesis of schizophrenia

In brief, the contribution of the dopaminergic system in schizophrenia is strongly suggested since D₂R blockade is the underlying mechanism of action of antipsychotics, along with evidence that sustained exposure to amphetamine, which increases dopamine release, can produce psychotic symptoms (Laruelle and Abi-Dargham, 1999). PET studies have shown increased dopamine turnover (Lindstrom et al., 1999), enhanced amphetamine-induced dopamine release (Laruelle and Abi-Dargham, 1999) as well as higher basal occupation of D₂R by dopamine (Abi-Dargham et al., 2000) in schizophrenic patients.

These findings involving the dopaminergic system in schizophrenia are potentially compatible with adenosine deficit. Presynaptically, the increased dopamine turnover (Lindstrom et al., 1999) and the amphetamine-induced release of dopamine in schizophrenia (Laruelle, 2000) are in line with i) the inhibitory effect of A1R on dopamine release (Golembiowska and Zylewska, 1998) and ii) the potentiation of amphetamine-induced locomotion (Popoli et al., 1994) and dopamine release in the nucleus accumbens by A1R antagonists (Solinas et al., 2002). The increased basal occupancy of D₂R by dopamine in schizophrenic patients (Abi-Dargham et al., 2000) could be related to a decreased A2AR effect on D₂R, thus increasing the affinity of D₂R for dopamine (Ferre et al., 1991). These mechanisms probably contribute to the antipsychotic-like profile of adenosine receptor agonists (Ferre, 1997; Kafka and Corbett, 1996; Rimondini et al., 1998), the somewhat similar behavioral stimulation produced by caffeine and amphetamine, and the reversal of caffeine-induced behaviors by antipsychotics (Ferre, 1997; Powell et al., 2001). Moreover, the unaltered affinity of D₂R in schizophrenic patients, evidenced in a PET study using a dopaminergic *antagonist* to displace the radioligand (Farde et al., 1990), is also consistent with the fact that adenosine only changes the affinity of dopamine receptors for *agonists*, but not for *antagonists* (Ferre et al., 1991).

It is also worth mentioning that adenosine modulation of the dopaminergic system is more pronounced in mesolimbic compared to nigrostriatal pathways (Ferre, 1997; Kafka and Corbett, 1996; Karcz-Kubicha et al., 2003; Stoner et al., 1988), which is coherent with schizophrenia. This could be related to: i) the selective increase in dopamine and glutamate release in the shell (mesolimbic-related) but not the core (nigrostriatal-related) of the nucleus accumbens by caffeine and an A1R antagonist (Solinas et al., 2002) and ii) post-synaptic A2A- D₂ receptor interactions, which are

possibly more prominent where extracellular dopamine concentration is lower (Pinna et al., 1997), i.e. the ventral compared to the dorsal striatum (Seeman and Tallerico, 1998).

A process of neurochemical sensitization similar to that induced by repeated treatment with dopamine stimulants has been suggested for the pathophysiology of schizophrenia (Laruelle, 2000; Lieberman et al., 1997). In this regard, it should be noted that chronic treatment with cocaine, which is also a model of psychosis, reduces the sensitivity of mesolimbic dopaminergic pathways to the inhibitory action of adenosine mediated by A1R (Manzoni et al., 1998; Toda et al., 2003), with unchanged responses to dopamine itself and agonists of metabotropic glutamate receptors. This effect seems to be related to increased adenosine uptake (Manzoni et al., 1998) or reduced externalization of A1R (Toda et al., 2003). Accordingly, a A1R agonist inhibited the expression of sensitization induced by methamphetamine (Shimazoe et al., 2000) and A1R blockade prevents the extinction of cocaine-seeking behavior in mice (Kuzmin et al., 1999). In summary, adenosine hypofunction could play a role in both pre- and post-synaptic alterations of the dopaminergic system in schizophrenia.

Adenosine and the glutamate hypothesis of schizophrenia

Glutamate, the main excitatory neurotransmitter in the CNS, acts on ionotropic (NMDA, AMPA and kainate) and metabotropic (mGlu) receptors (Krystal et al., 2002; Olney and Farber, 1995). Besides its well-documented role in several physiological processes, such as learning and memory, hyperactivation of the glutamatergic system leads to excitotoxicity, which is presumed to take part in neurodegenerative and ischemic conditions (Olney and Farber, 1995). With respect to

schizophrenia, NMDA receptor antagonists (phencyclidine, ketamine and MK-801) are able to produce positive, negative and cognitive symptoms of schizophrenia, instead of inducing only positive symptoms as in the case of amphetamine (Krystal et al., 2002; Olney and Farber, 1995). However, it is noteworthy that NMDA antagonists rarely produce auditory hallucinations and they can cause bradikinesia and a dissociative state distinct from schizophrenia (Krystal et al., 2002). Regarding treatment, adjunctive treatment with glycine or a glycine transport inhibitor, which increase NMDA receptor activity, reduced negative symptoms and possibly also positive symptoms (Heresco-Levy et al., 1999; Tsai et al., 2004). The NMDA dysfunction hypothesis, as proposed by Olney and Farber (Olney and Farber, 1995), also provided a neurochemical explanation for the age of onset of the disease, since the susceptibility to neurotoxic effects of NMDA antagonists starts in puberty and gradually increases up to adulthood in rats as well as in humans. Moreover, the anesthetic ketamine induces schizophrenia-like symptoms in adults, but not in children (Olney and Farber, 1995).

Moghaddam et al. (Moghaddam et al., 1997) found that NMDA antagonists also stimulate glutamate release, which would lead to overstimulation of other glutamate receptor subtypes. Accordingly, non-NMDA receptor antagonists inhibit hyperlocomotion and neurotoxicity induced by NMDA antagonists (Hauber and Andersen, 1993; Olney and Farber, 1995), and a mGlu receptor agonist (II/III subtypes), which inhibits glutamate release, reversed locomotor and cognitive effects of phencyclidine without affecting increased dopamine release (Moghaddam and Adams, 1998). However, Adams and Moghaddam (Adams and Moghaddam, 1998) also pointed out that the time-course of increased locomotion induced by

phencyclidine in rats was temporally dissociated from increases in dopamine and glutamate levels.

Adenosine has been well characterized as an endogenous modulator of glutamatergic activity, inhibiting glutamate release and also the post-synaptic action of excitatory neurotransmitters upon neuronal hyperpolarization via A1R (Dunwiddie and Masino, 2001). In animal models of schizophrenia, A1 and A2AR agonists have been repeatedly shown to prevent behavioral as well as neurophysiological (EEG and prepulse inhibition) alterations induced by NMDA antagonists (Browne and Welch, 1982; Kafka and Corbett, 1996; Popoli et al., 1997; Rimondini et al., 1997; Sills et al., 1999), indicating a potential antipsychotic effect in humans. Regarding the paradox that A1R agonists inhibit actions of both glutamate and NMDA receptor antagonists, one should consider the evidence that NMDA antagonists also produce increased glutamate release, as outlined above. Similarly to mGluR1/III receptor agonists (Anand et al., 2000; Moghaddam and Adams, 1998), A1R agonists probably reverse the effects of NMDA receptor antagonists by inhibiting glutamate release. It is also worth mentioning that *activation* of NMDA receptors promotes adenosine *release* in the striatum and the hippocampus (Craig and White, 1993; Manzoni et al., 1994; Melani et al., 1999), but the effect of NMDA receptor antagonists on basal adenosine release at doses that increase locomotor behavior is yet to be determined. We recently found that chronic treatment with caffeine, which produces tolerance to its own acute locomotor effects, produced nearly complete cross-tolerance to the behavioral stimulation induced by MK-801 in mice without altering normal exploratory behavior (Dall'Igna et al., 2003). This effect is dose and time dependent (full effect with 1 mg/ml of caffeine in drinking water for 7 days) and includes cognitive alterations but not ataxia when the minimum disruptive dose of MK-801 is used in each task (de Oliveira

et al., 2005). In other words, in mice adapted to function with a lower adenosine tonus by caffeine chronic treatment (Dall'Igna et al., 2003), antagonism of NMDA receptors produces minor behavioral effects. Interestingly, dopamine and glutamate release induced by an A1R antagonist in the nucleus accumbens was abolished after chronic caffeine treatment in rats (Quarta et al., 2004), which may be related to the behavioral cross-tolerance between caffeine and MK-801. Finally, a recent study showed that A1R activation completely prevents neurotoxicity, increased *c-fos* expression and acetylcholine release induced by an NMDA receptor antagonist in rats (Okamura et al., 2004). Based on these findings, the NMDA hypofunction model may also produces a state of adenosine hypofunction, probably by reducing adenosine release and impairing A1R activity, and this mechanism may contribute to behavioral effects of NMDA receptor antagonists.

Krystal et al. (Krystal et al., 2002) pointed out that NMDA receptor antagonists preferentially inhibit the activity of inhibitory interneurons in the hippocampus, leading to hyperexcitability of pyramidal neurons. Accordingly, Olney and Farber (Olney and Farber, 1995) suggested that impaired activity of inhibitory interneurons stimulated by NMDA receptors would be equivalent to the state produced by NMDA receptor blockade. Of interest, Manzoni et al. (Manzoni et al., 1994) demonstrated that NMDA application to the hippocampus produced a synaptic inhibition mediated by adenosine rather than by GABA or nitric oxide, probably from inhibitory interneurons. This study confirmed previous findings of NMDA stimulation of adenosine release (Chen et al., 1992; Craig and White, 1993). Along with these results, administration of low doses of NMDA reduces locomotion in a manner reversible by theophylline and an A1 adenosine receptor antagonist but not by

amphetamine (Gimenez-Llort et al., 1995; Von Lubitz et al., 1993) and increases striatal adenosine release in vivo (Melani et al., 1999).

Adenosine, inhibitory deficit and sensory gating

Schizophrenic patients show deficits in sensory gating, which relate to the ability to filter irrelevant stimuli, suggesting a deficient brain inhibitory activity (Adler et al., 1998). Adenosine has also been shown to influence neurophysiological responses of sensory gating, such as the P50 evoked potential and prepulse inhibition (Lara, 2002). In the P50 suppression paradigm, when two auditory stimuli are presented 500 ms apart, the amplitude of the second response (Kurumaji and Toru, 1998), compared to the first (S1), is markedly attenuated in healthy subjects (Adler et al., 1998). We have recently found that the adenosine antagonist theophylline (6.6 mg/kg) impaired sensory gating measured with the P50 paradigm in healthy volunteers, resembling the findings in schizophrenics (Ghisolfi et al., 2002). Theophylline treatment significantly increased P50 ratio (S2/S1 or test/conditioning) from 0.28 at baseline to 0.82, which was not significantly different from the schizophrenia group (0.74). This characteristic activity-dependent inhibition of the P50 paradigm is compatible with the short-lived inhibitory actions of adenosine reported upon repetitive stimulation at physiological levels in the hippocampus (Mitchell et al., 1993), which is involved in the development of the P50 inhibitory response (Adler et al., 1998; Ghisolfi et al., 2002). In PPI, which is mostly regulated by mesolimbic dopaminergic pathways, a weak stimulus presented immediately prior to a startling stimulus attenuates the startle response. Although adenosine receptor antagonists have not been shown to produce PPI *per se*, combined administration of theophylline and the dopamine receptor agonist apomorphine, in doses devoid of significant effects on their own, significantly reduced

PPI (Koch and Hauber, 1998). Moreover, A2AR knockout mice show reduced PPI and startle habituation (Wang et al., 2003). Taken together, these results suggest a modulatory role of adenosine in normal sensory gating and possibly the alterations in schizophrenic patients. In a broader sense, impaired inhibitory neuromodulation by adenosine may produce widespread synaptic dysfunction affecting the action of several neurotransmitters.

This inhibitory deficit has also been attributed to reduced GABAergic activity [114]. However, several GABAergic drugs (benzodiazepines, barbiturates, valproate, baclofen) tested in schizophrenia have mostly failed to provide a satisfactory response regarding core symptoms (Hesslinger et al., 1999) or only target anxiety and psychomotor agitation (Winterer and Hermann, 2000), therefore not being regarded as effective treatment for schizophrenia in current practice.

Adenosine receptor antagonists as pharmacological models of schizophrenia

If reduced adenosinergic tone were present in schizophrenia, it would be expected that adenosine antagonists mimicked certain features of the disease (see Table 1). Caffeine and theophylline or selective A1R antagonists as pharmacological models of schizophrenia transiently produce adenosine hypofunction and therefore are not expected to reflect changes they may have resulted from brain loss.

Similarly to amphetamine and NMDA receptor antagonists, caffeine and theophylline produce hyperlocomotor responses in rodents, which are counteracted by antipsychotics (Ferre, 1997). In healthy subjects, usual doses are not psychotomimetic but high doses of adenosine antagonists can produce psychosis (Hughes et al., 1998; Mackay and Rollins, 1989; Mansheim, 1989; McManamy and

Schube, 1936) and other symptoms commonly observed in schizophrenia such as anxiety, restlessness and insomnia, besides worsening psychosis and cognitive symptoms in schizophrenic patients (De Freitas and Schwartz, 1979; Lucas et al., 1990; Mikkelsen, 1978). Interestingly, the increment of thought disorder, unusual thought content and euphoria/activation with caffeine occurred despite ongoing treatment with the potent D₂R antagonist fluphenazine, suggesting also an effect independent of the A_{2A}- D₂R interaction and possibly involving A₁R blockade. Regarding neuropsychological deficits, high doses of caffeine cause an impaired performance of the Stroop task in healthy volunteers (Foreman et al., 1989), which is observed in schizophrenic patients.

Increased smoking, both in prevalence and number of cigarettes, is also frequently observed in schizophrenia and has been proposed to be due to alterations in the cholinergic system, which would be transiently corrected by nicotine (Adler et al., 1998). However, adenosine hypofunction may be an alternative explanation, since rats chronically treated with caffeine double self-administration of nicotine and develop this behavior faster than control animals (Shoaib et al., 1999). Moreover, combined intake of nicotine and caffeine is often observed in humans (Shoaib et al., 1999).

Insomnia is a recurrent complaint among schizophrenic patients, often requiring high doses of sedative antipsychotics and hypnotics. Keshavan and colleagues (Keshavan et al., 1998) reported that patients present reduced sleep time, more awakenings and decreased delta activity particularly at 1-2 hz. This is the same profile induced by a low-dose of caffeine (100 mg) given before sleep in normal volunteers (Landolt et al., 1995), although in schizophrenia the changes are more intense.

Adenosine receptor antagonists do not produce behavioral effects resembling negative symptoms. These symptoms may be more related to abnormalities of the white matter (Davis et al., 2003; Shenton et al., 2001), where A1R are scarce in the adult human brain (Bauer et al., 2003). However, this does not exclude the possibility that adenosine A1R present in white matter during early brain development may play a role if pre- and peri-natal events leading to increased adenosine levels take place, as mentioned above.

The low potency of caffeine and theophylline as adenosine receptor antagonists may contribute to the lack of prominent psychotropic effects at habitual doses. Similarly, some agents that increase dopaminergic activity (methylphenidate and bupropion) or block NMDA receptors (memantine) cannot be considered good models for the dopamine and glutamate models of psychosis or schizophrenia.

Treated adenosine deaminase deficiency with severe combined immunodeficiency (ADA-SCID) as a possible human model of schizophrenia

As previously noted, mice lacking adenosine deaminase showed increased brain ventricles compared to healthy wild-type mice and similar to wild-type mice exposed to hypoxia (Turner et al., 2003), which suggests the neurotoxic effect of adenosine in the immature brain. In humans, adenosine deaminase deficiency leads to immunodeficiency that can be treated with gene therapy, bone marrow transplantation and enzyme replacement therapy with bovine adenosine deaminase (Aiuti et al., 2003). Treatment of the most severe cases is carried on within the first months of life. Thus, this disease may provide a model for the adenosine hypothesis of schizophrenia, with increased pre and perinatal adenosine accumulation in the brain that may be attenuated by treatment. Of interest, Rogers et al. (Rogers et al.,

2001) reported the following cognitive and behavioral abnormalities in 11 ADA-SCID patients treated with bone marrow transplantation: mean cognitive function in the below-average normal range that correlated with a biochemical index of disease severity before treatment (most had IQ between 50 and 90, which was inversely correlated with the severity of biochemical alterations), significant behavioral problems of hyperactivity, attention, conduct and peer relationships; normal gross neurological examination. Patients' ages ranged from 1 to 18 years and they found a major correlation between Child Behavior Checklist score and age ($r = 0.73$; $p = 0.026$), with high scores in adolescents. This temporal profile resembles the onset of schizophrenia and indirectly reinforces the idea that late ontogenetic changes of the adenosine system may take place in adolescence. If valid as a human model of schizophrenia, schizophreniform clinical presentations and brain alterations may occur in some less severely affected patients.

Adenosine and purines in the treatment of schizophrenia

Unfortunately, adenosine direct or indirect agonists with clear effects on the brain are not yet available for human use. However, add-on treatment with the adenosine transporter inhibitor dipyridamole was beneficial for schizophrenic patients on 20 mg haloperidol daily for positive symptoms, which was suggested to derive from adenosine-dopamine interactions (Akhondzadeh et al., 2000). We proposed that the interaction of adenosine through A1R with other neurotransmitter systems (e.g. glutamate) would be more likely to account for this benefit since dopaminergic activity is practically abolished by haloperidol 20 mg a day (Brunstein et al., 2001). One limitation of dipyridamole is the uncertainty regarding its penetration in the brain. To

our knowledge, it has not been shown that its peripheral administration increases central adenosine levels.

Allopurinol is an inhibitor of the enzyme xanthine oxidase, the final step in purine metabolism, converting hypoxanthine in xanthine and xanthine in uric acid (see Figure 2). The accumulation of hypoxanthine and xanthine may favor the action of the enzyme HGPRT, which is responsible for purine salvage (Nyhan, 1997), possibly increasing purine levels (Lara et al., 2000; Mateos et al., 1987). We have tested the effect of allopurinol, classically used for hyperuricemia and gout, as add-on therapy in schizophrenic patients previously refractory to typical antipsychotics. We observed clinically relevant improvement in about half of the patients (Lara et al., 2001), which was recently confirmed in a randomized crossover placebo-controlled trial with allopurinol in combination with patients' ongoing antipsychotic regimen (mean 550 mg/day of chlorpromazine equivalents) (Brunstein et al., 2004). Nine out of the 22 patients who completed both arms (total of 12 weeks) responded to allopurinol, compared to none during the placebo phase. Response was more pronounced for positive symptoms and responders had shorter disease duration. An independent clinical trial confirmed the efficacy of add-on allopurinol on positive and general, but not negative symptoms of schizophrenia in acute patients treated with haloperidol 15 mg/day (Akhondzadeh et al., 2005). Despite these encouraging results, allopurinol has to be regarded as a treatment targeting purine metabolism, rather than directly increasing adenosine. The neuroprotective profile of allopurinol observed in several models of brain injury (Harrison, 2002) make allopurinol treatment appealing for further studies in schizophrenia. Additionally, we observed an anti-aggressive effect of allopurinol in patients with refractory aggressive behavior due to neurological conditions (Lara et al., 2000) and dementia (Lara et al., 2003).

Adenosine may also play a role in the efficacy of some biological treatments of schizophrenia. The therapeutic effect of glycine and analogs are targeted to increase NMDA activity, and as noted earlier, treatment with low-dose NMDA (which would roughly correspond to the effect of glycine on NMDA receptors) induces adenosine release (Melani et al., 1999) and sedation that is reversed by theophylline and an A1R antagonist but not amphetamine (Gimenez-Llort et al., 1995; Karcz-Kubicha et al., 2003). Also, electroconvulsant therapy (ECT) and transcranial magnetic stimulation (TMS), despite varying degrees of evidence in terms of efficacy, probably increase adenosine release (Dunwiddie and Masino, 2001). These evidence suggest that, even if adenosine is not involved in the neurobiology of schizophrenia, it should be considered as a promising target for developing new treatments.

Direct findings involving adenosine and the purinergic system in schizophrenia

Despite the eminent modulatory role of adenosine in the brain, studies on adenosine and the purinergic system in schizophrenia are strikingly scarce yet and are restricted to the A2AR. A post-mortem study reported an increased density of A2AR in the striatum of schizophrenic patients (Kurumaji and Toru, 1998), with no difference between those on and off medication before death. Although the authors interpreted this finding as a compensatory up-regulation of A2AR resulting from dopaminergic hyperfunction, we propose that a more straightforward explanation could be a classical compensatory up-regulation to reduced adenosinergic activity, which could in turn produce or contribute to the hyperdopaminergic state (Lara and Souza, 2000). Indeed, using the same A2AR radioligand, Johansson et al. (1997) showed striatal up-regulation of these receptors in rats chronically treated with high

doses of caffeine. However, Deckert et al. (2003) confirmed the up-regulation of A2AR but found a correlation with previous antipsychotic doses, which agrees with data from rodents chronically treated with antipsychotics (Parsons et al., 1995).

Regarding genetics, two studies have failed to find an association with A2AR and schizophrenia (Deckert, 1996, Hong et al., 2005) whereas one study found an association of an A2AR polymorphism and negative symptoms. However, G_{olf} , the G-protein coupled to A2A receptors (Kull et al., 2000), is a candidate gene for schizophrenia and functional psychosis (Schwab et al., 1998). Interestingly, G_{olf} is predominantly expressed in nucleus accumbens and caudate-putamen and heterozygous G_{olf} knock-out mice showed markedly reduced locomotor activation by both caffeine and amphetamine (Herve et al., 2001)

Limitations of the adenosine hypothesis

Since adenosine has been scarcely studied in psychiatry, despite its important neuromodulatory and homeostatic roles in the brain, this model is mostly based on evidence from basic science and limited to indirect evidence in humans. Most neurochemical models in psychiatry rely on the pharmacological actions of drugs that treat or produce mental symptoms. In the case of adenosine, the non-selective adenosine receptor antagonists caffeine and theophylline are available for human use and no direct or indirect agonists that penetrate the blood-brain-barrier have been produced. Ironically, caffeine is the most widely consumed psychoactive drug in the world. However, individual experience with caffeine shapes the dose and use pattern for optimal effect without prominent adverse events. Also, the low potency of caffeine as an adenosine antagonist may prevent severe psychotropic effects.

High caffeine intake has been observed in schizophrenia patients (Hughes et al., 1998), which goes against this model. However, to our knowledge it has not been studied if it is a strategy to counteract excessive D₂R blockade by antipsychotics, which is possible considering the antiparkinsonian effects of caffeine (Svenningsson and Fredholm, 2003). Interestingly, patients with schizophrenia seem less susceptible to anxiety induced by caffeine, although positive symptoms were exacerbated at high doses (Lucas et al., 1990).

Based on the preclinical effects of adenosine agents and on the therapeutic efficacy of allopurinol mostly for positive symptoms, the explanatory power for the role of adenosine in negative and cognitive symptoms is weaker, relying mostly on the neurodevelopmental effects of adenosine.

So far, the only plausible mechanism proposed that could lead to adenosine dysfunction is by pre- and perinatal events producing neural damage via A1 receptors. Such event is expected to reduce A1R expression in the adult brain, but this is still to be evaluated in schizophrenia. Similarly, except for the A2AR gene, genetic association studies of enzymes, transporters and receptors related to adenosine in schizophrenia have not yet been conducted.

Concluding remarks

By definition, a model proposing adenosine as a contributing element in the pathophysiology of schizophrenia embraces several neurotransmitters and brain regions due to its multiple and widespread modulatory actions. Based on current evidence from animal studies, the most likely mechanism to produce adenosine hypofunction is through a pre- or peri-natal event transiently increasing adenosine levels, producing neurotoxicity particularly in neuropils containing A1R (first hit). With

increasing inhibitory action of adenosine during adolescence and early adulthood, an inhibitory deficit would produce a hyperdopaminergic state, synaptic and connective instability as well as increased vulnerability to excitatory activity mediated by glutamate, leading to clinical deterioration and slow progressive brain loss (second hit) (Figure 3).

Further research on the adenosine system in schizophrenia, such as determination of A1R density and testing of adenosine-enhancing strategies for treatment, will hopefully bring new insights and effective treatments for this disabling mental disorder.

Acknowledgments. We dedicate this paper to Prof. Diogo O. Souza, who endlessly supported us in developing and studying this new hypothesis, besides being a model scientist and a true friend. This line of research has been supported by grants from CNPq and FAPERGS from Brazil, as well as the Stanley Medical Research Institute.

Reference List

Abi-Dargham, A., Rodenhiser, J., Printz, D., Zea-Ponce, Y., Gil, R., Kegeles, L.S., Weiss, R., Cooper, T.B., Mann, J.J., Van Heertum, R.L., Gorman, J.M., and Laruelle, M., 2000. Increased baseline occupancy of D₂ receptors by dopamine in schizophrenia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 14, 8104-8109.

Adams, B. and Moghaddam, B., 1998. Corticolimbic dopamine neurotransmission is temporally dissociated from the cognitive and locomotor effects of phencyclidine. *J. Neurosci.* 14, 5545-5554.

Adler, L.E., Olincy, A., Waldo, M., Harris, J.G., Griffith, J., Stevens, K., Flach, K., Nagamoto, H., Bickford, P., Leonard, S., and Freedman, R., 1998. Schizophrenia, sensory gating, and nicotinic receptors. *Schizophr. Bull.* 2, 189-202.

Aiuti, A., Ficara, F., Cattaneo, F., Bordignon, C., and Roncarolo, M.G., 2003. Gene therapy for adenosine deaminase deficiency. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 6, 461-466.

Akhondzadeh, S., Safarcherati, A., and Amini, H., 2005. Beneficial antipsychotic effects of allopurinol as add-on therapy for schizophrenia: a double blind, randomized and placebo controlled trial. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 2, 253-259.

Akhondzadeh, S., Shasavand, E., Jamilian, H., Shabestari, O., and Kamalipour, A., 2000. Dipyridamole in the treatment of schizophrenia: adenosine-dopamine receptor interactions. *J. Clin. Pharm. Ther.* 2, 131-137.

Anand, A., Charney, D.S., Oren, D.A., Berman, R.M., Hu, X.S., Cappiello, A., and Krystal, J.H., 2000. Attenuation of the neuropsychiatric effects of ketamine with lamotrigine: support for hyperglutamatergic effects of N-methyl-D-aspartate receptor antagonists. *Arch. Gen. Psychiatry* 3, 270-276.

Bauer, A., Holschbach, M.H., Meyer, P.T., Boy, C., Herzog, H., Olsson, R.A., Coenen, H.H., and Zilles, K., 2003. In vivo imaging of adenosine A1 receptors in the human brain with [18F]CPFPX and positron emission tomography. *Neuroimage.* 4, 1760-1769.

Browne, R.G. and Welch, W.M., 1982. Stereoselective antagonism of phencyclidine's discriminative properties by adenosine receptor agonists. *Science* 4565, 1157-1159.

Brunstein, M.G., Belmonte-de-Abreu, P., Souza, D.O., and Lara, D.R., 2001. Therapeutic benefit of adjunctive dipyridamole in schizophrenia is probably due to adenosine-glutamate interactions. *J. Clin. Pharm. Ther.* 2, 155-156.

Brunstein, M.G., Ghisolfi, E.S., Ramos, F.L., and Lara, D.R., 2004. Clinical trial for allopurinol adjuvant therapy for poorly responsive schizophrenia. *Schizophr. Res* S142-

Bullmore, E.T., Frangou, S., and Murray, R.M., 1997. The dysplastic net hypothesis: an integration of developmental and dysconnectivity theories of schizophrenia. *Schizophr. Res* 2-3, 143-156.

Casado, V., Mallol, J., Lluís, C., Franco, R., and Canela, E.I., 1991. Adenosine receptors in myelin fractions and subfractions: the effect of the agonist (R)-phenylisopropyladenosine on myelin membrane microviscosity. *J. Neurochem.* 5, 1623-1629.

Chen, J.F., Beilstein, M., Xu, Y.H., Turner, T.J., Moratalla, R., Standaert, D.G., Aloyo, V.J., Fink, J.S., and Schwarzschild, M.A., 2000. Selective attenuation of psychostimulant-induced behavioral responses in mice lacking A(2A) adenosine receptors. *Neuroscience* 1, 195-204.

Chen, Y., Graham, D.I., and Stone, T.W., 1992. Release of endogenous adenosine and its metabolites by the activation of NMDA receptors in the rat hippocampus in vivo. *Br. J. Pharmacol.* 3, 632-638.

Craig, C.G. and White, T.D., 1993. N-methyl-D-aspartate- and non-N-methyl-D-aspartate-evoked adenosine release from rat cortical slices: distinct purinergic sources and mechanisms of release. *J. Neurochem.* 3, 1073-1080.

Cunha, R.A., 2001. Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. *Neurochem. Int.* 2, 107-125.

Dall'Igna, O.P., Da Silva, A.L., Dietrich, M.O., Hoffmann, A., de Oliveira, R.V., Souza, D.O., and Lara, D.R., 2003. Chronic treatment with caffeine blunts the hyperlocomotor but not cognitive effects of the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist MK-801 in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 3, 258-263.

Davis, K.L., Stewart, D.G., Friedman, J.I., Buchsbaum, M., Harvey, P.D., Hof, P.R., Buxbaum, J., and Haroutunian, V., 2003. White matter changes in schizophrenia: evidence for myelin-related dysfunction. *Arch. Gen. Psychiatry* 5, 443-456.

De Freitas, B. and Schwartz, G., 1979. Effects of caffeine in chronic psychiatric patients. *Am. J. Psychiatry* 10, 1337-1338.

de Mendonca, A., Sebastiao, A.M., and Ribeiro, J.A., 2000. Adenosine: does it have a neuroprotective role after all? *Brain Res Brain Res Rev.* 2-3, 258-274.

de Oliveira, R.V., Dall'Igna, O.P., Tort, A.B., Schuh, J.F., Neto, P.F., Santos Gomes, M.W., Souza, D.O., and Lara, D.R., 2005. Effect of subchronic caffeine treatment on MK-801-induced changes in locomotion, cognition and ataxia in mice. *Behav. Pharmacol.* 2, 79-84.

Deckert, J., Brenner, M., Durany, N., Zochling, R., Paulus, W., Ransmayr, G., Tatschner, T., Danielczyk, W., Jellinger, K., and Riederer, P., 2003. Up-regulation of striatal adenosine A_{2A} receptors in schizophrenia. *Neuroreport* 3, 313-316.

Doriat, J.F., Humbert, A.C., and Daval, J.L., 1996. Brain maturation of high-affinity adenosine A₂ receptors and their coupling to G-proteins. *Brain Res Dev. Brain Res* 1-2, 1-9.

Dumas, T.C. and Foster, T.C., 1998. Late developmental changes in the ability of adenosine A1 receptors to regulate synaptic transmission in the hippocampus. *Brain Res Dev. Brain Res* 1, 137-139.

Dunwiddie, T.V. and Masino, S.A., 2001. The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* 31-55.

Farde, L., Wiesel, F.A., Stone-Elander, S., Halldin, C., Nordstrom, A.L., Hall, H., and Sedvall, G., 1990. D₂ dopamine receptors in neuroleptic-naive schizophrenic patients. A positron emission tomography study with [¹¹C]raclopride. *Arch. Gen. Psychiatry* 3, 213-219.

Ferre, S., 1997. Adenosine-dopamine interactions in the ventral striatum. Implications for the treatment of schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl)* 2, 107-120.

Ferre, S., von Euler, G., Johansson, B., Fredholm, B.B., and Fuxe, K., 1991. Stimulation of high-affinity adenosine A2 receptors decreases the affinity of dopamine D₂ receptors in rat striatal membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 16, 7238-7241.

Foreman, N., Barraclough, S., Moore, C., Mehta, A., and Madon, M., 1989. High doses of caffeine impair performance of a numerical version of the Stroop task in men. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2, 399-403.

Fredholm, B.B., Battig, K., Holmen, J., Nehlig, A., and Zvartau, E.E., 1999. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacol. Rev.* 1, 83-133.

Ghisolfi, E.S., Prokopiuk, A.S., Becker, J., Ehlers, J.A., Belmonte-de-Abreu, P., Souza, D.O., and Lara, D.R., 2002. The adenosine antagonist theophylline impairs p50 auditory sensory gating in normal subjects. *Neuropsychopharmacology* 4, 629-637.

Gimenez-Llort, L., Fernandez-Teruel, A., Escorihuela, R.M., Fredholm, B.B., Tobena, A., Pekny, M., and Johansson, B., 2002. Mice lacking the adenosine A1 receptor are anxious and aggressive, but are normal learners with reduced muscle strength and survival rate. *Eur. J. Neurosci.* 3, 547-550.

Gimenez-Llort, L., Martinez, E., and Ferre, S., 1995. Dopamine-independent and adenosine-dependent mechanisms involved in the effects of N-methyl-D-aspartate on motor activity in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 2, 171-177.

Gogtay, N., Sporn, A., Clasen, L.S., Nugent, T.F., III, Greenstein, D., Nicolson, R., Giedd, J.N., Lenane, M., Gochman, P., Evans, A., and Rapoport, J.L., 2004. Comparison of progressive cortical gray matter loss in childhood-onset schizophrenia with that in childhood-onset atypical psychoses. *Arch. Gen. Psychiatry* 1, 17-22.

Golembiowska, K. and Zylewska, A., 1998. Agonists of A1 and A2A adenosine receptors attenuate methamphetamine-induced overflow of dopamine in rat striatum. *Brain Res* 2, 202-209.

Guillet, R., 1990. Neonatal caffeine exposure alters adenosine receptor control of locomotor activity in the developing rat. *Dev. Pharmacol. Ther.* 2, 94-100.

Harrison, R., 2002. Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? *Free Radic. Biol. Med.* 6, 774-797.

Hauber, W. and Andersen, R., 1993. 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.* 5, 486-490.

Heresco-Levy, U., Javitt, D.C., Ermilov, M., Mordel, C., Silipo, G., and Lichtenstein, M., 1999. Efficacy of high-dose glycine in the treatment of enduring negative symptoms of schizophrenia. *Arch. Gen. Psychiatry* 1, 29-36.

Herve, D., Le Moine, C., Corvol, J.C., Belluscio, L., Ledent, C., Fienberg, A.A., Jaber, M., Studler, J.M., and Girault, J.A., 2001. Galpha(olf) levels are regulated by receptor usage and control dopamine and adenosine action in the striatum. *J. Neurosci.* 12, 4390-4399.

Hesslinger, B., Normann, C., Langosch, J.M., Klose, P., Berger, M., and Walden, J., 1999. Effects of carbamazepine and valproate on haloperidol plasma levels and on psychopathologic outcome in schizophrenic patients. *J. Clin. Psychopharmacol.* 4, 310-315.

Hillion, J., Canals, M., Torvinen, M., Casado, V., Scott, R., Terasmaa, A., Hansson, A., Watson, S., Olah, M.E., Mallol, J., Canela, E.I., Zoli, M., Agnati, L.F., Ibanez, C.F., Lluís, C., Franco, R., Ferre, S., and Fuxe, K., 2002. Coaggregation, cointernalization, and codesensitization of adenosine A_{2A} receptors and dopamine D₂ receptors. *J. Biol. Chem.* 20, 18091-18097.

Hong, C.J., Liu, H.C., Liu, T.Y., Liao, D.L., and Tsai, S.J., 2005. Association studies of the adenosine A_{2a} receptor (1976T>C) genetic polymorphism in Parkinson's disease and schizophrenia. *J. Neural Transm.*

Hughes, J.R., McHugh, P., and Holtzman, S., 1998. Caffeine and schizophrenia. *Psychiatr. Serv.* 11, 1415-1417.

Johansson, B., Georgiev, V., Lindstrom, K., and Fredholm, B.B., 1997. A₁ and A_{2A} adenosine receptors and A₁ mRNA in mouse brain: effect of long-term caffeine treatment. *Brain Res* 1-2, 153-164.

Johansson, B., Halldner, L., Dunwiddie, T.V., Masino, S.A., Poelchen, W., Gimenez-Llort, L., Escorihuela, R.M., Fernandez-Teruel, A., Wiesenfeld-Hallin, Z., Xu, X.J., Hardemark, A., Betsholtz, C., Herlenius, E., and Fredholm, B.B., 2001. Hyperalgesia, anxiety, and decreased hypoxic neuroprotection in mice lacking the adenosine A1 receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 16, 9407-9412.

Kafka, S.H. and Corbett, R., 1996. Selective adenosine A2A receptor/dopamine D₂ receptor interactions in animal models of schizophrenia. *Eur. J. Pharmacol.* 2-3, 147-154.

Karcz-Kubicha, M., Quarta, D., Hope, B.T., Antoniou, K., Muller, C.E., Morales, M., Schindler, C.W., Goldberg, S.R., and Ferre, S., 2003. Enabling role of adenosine A1 receptors in adenosine A2A receptor-mediated striatal expression of c-fos. *Eur. J. Neurosci.* 2, 296-302.

Keshavan, M.S., Reynolds, C.F., III, Miewald, M.J., Montrose, D.M., Sweeney, J.A., Vasko, R.C., Jr., and Kupfer, D.J., 1998. Delta sleep deficits in schizophrenia: evidence from automated analyses of sleep data. *Arch. Gen. Psychiatry* 5, 443-448.

Koch, M. and Hauber, W., 1998. Regulation of sensorimotor gating by interactions of dopamine and adenosine in the rat. *Behav. Pharmacol.* 1, 23-29.

Krystal, J.H., Anand, A., and Moghaddam, B., 2002. Effects of NMDA receptor antagonists: implications for the pathophysiology of schizophrenia. *Arch. Gen. Psychiatry* 7, 663-664.

Kull, B., Svenningsson, P., and Fredholm, B.B., 2000. Adenosine A(2A) receptors are colocalized with and activate g(olf) in rat striatum. *Mol. Pharmacol.* 4, 771-777.

Kurumaji, A. and Toru, M., 1998. An increase in [3H] CGS21680 binding in the striatum of postmortem brains of chronic schizophrenics. *Brain Res* 2, 320-323.

Kuzmin, A., Johansson, B., Zvartau, E.E., and Fredholm, B.B., 1999. Caffeine, acting on adenosine A(1) receptors, prevents the extinction of cocaine-seeking behavior in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2, 535-542.

Landolt, H.P., Dijk, D.J., Gaus, S.E., and Borbely, A.A., 1995. Caffeine reduces low-frequency delta activity in the human sleep EEG. *Neuropsychopharmacology* 3, 229-238.

Lang, U.E., Lang, F., Richter, K., Vallon, V., Lipp, H.P., Schnermann, J., and Wolfer, D.P., 2003. Emotional instability but intact spatial cognition in adenosine receptor 1 knock out mice. *Behav. Brain Res* 1-2, 179-188.

Lara, D.R., 2002. Inhibitory deficit in schizophrenia is not necessarily a GABAergic deficit. *Cell Mol. Neurobiol.* 3, 239-247.

Lara, D.R., Belmonte-de-Abreu, P., and Souza, D.O., 2000. Allopurinol for refractory aggression and self-inflicted behaviour. *J. Psychopharmacol.* 1, 81-83.

Lara, D.R., Brunstein, M.G., Ghisolfi, E.S., Lobato, M.I., Belmonte-de-Abreu, P., and Souza, D.O., 2001. Allopurinol augmentation for poorly responsive schizophrenia. *Int. Clin. Psychopharmacol.* 4, 235-237.

Lara, D.R., Cruz, M.R., Xavier, F., Souza, D.O., and Moriguchi, E.H., 2003. Allopurinol for the treatment of aggressive behaviour in patients with dementia. *Int. Clin. Psychopharmacol.* 1, 53-55.

Lara, D.R. and Souza, D.O., 2000. Schizophrenia: a purinergic hypothesis. *Med. Hypotheses* 2, 157-166.

Laruelle, M., 2000. The role of endogenous sensitization in the pathophysiology of schizophrenia: implications from recent brain imaging studies. *Brain Res Brain Res Rev.* 2-3, 371-384.

Laruelle, M. and Abi-Dargham, A., 1999. Dopamine as the wind of the psychotic fire: new evidence from brain imaging studies. *J. Psychopharmacol.* 4, 358-371.

Ledent, C., Vaugeois, J.M., Schiffmann, S.N., Pedrazzini, T., El Yacoubi, M., Vanderhaeghen, J.J., Costentin, J., Heath, J.K., Vassart, G., and Parmentier, M., 1997. Aggressiveness, hypoalgesia and high blood pressure in mice lacking the adenosine A2a receptor. *Nature* 6643, 674-678.

Lewis, D.A. and Levitt, P., 2002. Schizophrenia as a disorder of neurodevelopment. *Annu. Rev. Neurosci.* 409-432.

Lieberman, J., Chakos, M., Wu, H., Alvir, J., Hoffman, E., Robinson, D., and Bilder, R., 2001. Longitudinal study of brain morphology in first episode schizophrenia. *Biol. Psychiatry* 6, 487-499.

Lieberman, J.A., Sheitman, B.B., and Kinon, B.J., 1997. Neurochemical sensitization in the pathophysiology of schizophrenia: deficits and dysfunction in neuronal regulation and plasticity. *Neuropsychopharmacology* 4, 205-229.

Lindstrom, L.H., Gefvert, O., Hagberg, G., Lundberg, T., Bergstrom, M., Hartvig, P., and Langstrom, B., 1999. Increased dopamine synthesis rate in medial prefrontal cortex and striatum in schizophrenia indicated by L-(beta-11C) DOPA and PET. *Biol. Psychiatry* 5, 681-688.

Lucas, P.B., Pickar, D., Kelsoe, J., Rapaport, M., Pato, C., and Hommer, D., 1990. Effects of the acute administration of caffeine in patients with schizophrenia. *Biol. Psychiatry* 1, 35-40.

Mackay, D.C. and Rollins, J.W., 1989. Caffeine and caffeinism. *J. R. Nav. Med. Serv.* 2, 65-67.

Mansheim, P., 1989. A case of acute psychosis in temporal association with theophylline toxicity. *J. Clin. Psychopharmacol.* 1, 65-66.

Manzoni, O., Pujalte, D., Williams, J., and Bockaert, J., 1998. Decreased presynaptic sensitivity to adenosine after cocaine withdrawal. *J. Neurosci.* 19, 7996-8002.

Manzoni, O.J., Manabe, T., and Nicoll, R.A., 1994. Release of adenosine by activation of NMDA receptors in the hippocampus. *Science* 5181, 2098-2101.

Marangos, P.J., Patel, J., and Stivers, J., 1982. Ontogeny of adenosine binding sites in rat forebrain and cerebellum. *J. Neurochem.* 1, 267-270.

Mateos, F.A., Puig, J.G., Jimenez, M.L., and Fox, I.H., 1987. Hereditary xanthinuria. Evidence for enhanced hypoxanthine salvage. *J. Clin. Invest* 3, 847-852.

McManamy, M.C. and Schube, P.G., 1936. Caffeine intoxication. Report of case, symptoms of which amounted to psychosis. 616-

Melani, A., Corsi, C., Gimenez-Llort, L., Martinez, E., Ogren, S.O., Pedata, F., and Ferre, S., 1999. Effect of N-methyl-D-aspartate on motor activity and in vivo adenosine striatal outflow in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* 1, 15-19.

Mikkelsen, E.J., 1978. Caffeine and schizophrenia. *J. Clin. Psychiatry* 9, 732-736.

Mitchell, J.B., Lupica, C.R., and Dunwiddie, T.V., 1993. Activity-dependent release of endogenous adenosine modulates synaptic responses in the rat hippocampus. *J. Neurosci.* 8, 3439-3447.

Moghaddam, B., Adams, B., Verma, A., and 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. *J. Neurosci.* 8, 2921-2927.

Moghaddam, B. and Adams, B.W., 1998. Reversal of phencyclidine effects by a group II metabotropic glutamate receptor agonist in rats. *Science* 5381, 1349-1352.

Nehlig, A., Daval, J.L., and Debry, G., 1992. Caffeine and the central nervous system: mechanisms of action, biochemical, metabolic and psychostimulant effects. *Brain Res Brain Res Rev.* 2, 139-170.

Nyhan, W.L., 1997. The recognition of Lesch-Nyhan syndrome as an inborn error of purine metabolism. *J. Inherit. Metab Dis.* 2, 171-178.

Okamura, N., Hashimoto, K., Shimizu, E., Kumakiri, C., Komatsu, N., and Iyo, M., 2004. Adenosine A(1) receptor agonists block the neuropathological changes in rat retrosplenial cortex after administration of the NMDA receptor antagonist dizocilpine. *Neuropsychopharmacology* 3, 544-550.

Olney, J.W. and Farber, N.B., 1995. Glutamate receptor dysfunction and schizophrenia. *Arch. Gen. Psychiatry* 12, 998-1007.

Othman, T., Yan, H., and Rivkees, S.A., 2003. Oligodendrocytes express functional A1 adenosine receptors that stimulate cellular migration. *Glia* 2, 166-172.

Parsons, B., Togasaki, D.M., Kassir, S., and Przedborski, S., 1995. Neuroleptics up-regulate adenosine A2a receptors in rat striatum: implications for the mechanism and the treatment of tardive dyskinesia. *J. Neurochem.* 5, 2057-2064.

Pinna, A., Wardas, J., Cristalli, G., and Morelli, M., 1997. Adenosine A2A receptor agonists increase Fos-like immunoreactivity in mesolimbic areas. *Brain Res* 1, 41-49.

Popoli, P., Pezzola, A., and de Carolis, A.S., 1994. Modulation of striatal adenosine A1 and A2 receptors induces rotational behaviour in response to dopaminergic stimulation in intact rats. *Eur. J. Pharmacol.* 1-2, 21-25.

Popoli, P., Reggio, R., and Pezzola, A., 1997. Adenosine A1 and A2 receptor agonists significantly prevent the electroencephalographic effects induced by MK-801 in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 2-3, 143-146.

Powell, K.R., Iuvone, P.M., and Holtzman, S.G., 2001. The role of dopamine in the locomotor stimulant effects and tolerance to these effects of caffeine. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1-2, 59-70.

Quarta, D., Ferre, S., Solinas, M., You, Z.B., Hockemeyer, J., Popoli, P., and Goldberg, S.R., 2004. Opposite modulatory roles for adenosine A1 and A2A receptors on glutamate and dopamine release in the shell of the nucleus accumbens. Effects of chronic caffeine exposure. *J. Neurochem.* 5, 1151-1158.

Ralevic, V. and Burnstock, G., 1998. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol. Rev.* 3, 413-492.

Rimondini, R., Ferre, S., Gimenez-Llort, L., Ogren, S.O., and Fuxe, K., 1998. Differential effects of selective adenosine A1 and A2A receptor agonists on dopamine receptor agonist-induced behavioural responses in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 2-3, 153-158.

Rimondini, R., Ferre, S., Ogren, S.O., and Fuxe, K., 1997. Adenosine A2A agonists: a potential new type of atypical antipsychotic. *Neuropsychopharmacology* 2, 82-91.

Rivkees, S.A., Price, S.L., and Zhou, F.C., 1995. Immunohistochemical detection of A1 adenosine receptors in rat brain with emphasis on localization in the

hippocampal formation, cerebral cortex, cerebellum, and basal ganglia. *Brain Res* 2, 193-203.

Rogers, M.H., Lwin, R., Fairbanks, L., Gerritsen, B., and Gaspar, H.B., 2001. Cognitive and behavioral abnormalities in adenosine deaminase deficient severe combined immunodeficiency. *J. Pediatr.* 1, 44-50.

Schwab, S.G., Hallmayer, J., Lerer, B., Albus, M., Borrmann, M., Honig, S., Strauss, M., Segman, R., Lichtermann, D., Knapp, M., Trixler, M., Maier, W., and Wildenauer, D.B., 1998. Support for a chromosome 18p locus conferring susceptibility to functional psychoses in families with schizophrenia, by association and linkage analysis. *Am. J. Hum. Genet.* 4, 1139-1152.

Seeman, P. and Tallerico, T., 1998. Antipsychotic drugs which elicit little or no parkinsonism bind more loosely than dopamine to brain D₂ receptors, yet occupy high levels of these receptors. *Mol. Psychiatry* 2, 123-134.

Shenton, M.E., Dickey, C.C., Frumin, M., and McCarley, R.W., 2001. A review of MRI findings in schizophrenia. *Schizophr. Res* 1-2, 1-52.

Shimazoe, T., Yoshimatsu, A., Kawashimo, A., and Watanabe, S., 2000. Roles of adenosine A(1) and A(2A) receptors in the expression and development of methamphetamine-induced sensitization. *Eur. J. Pharmacol.* 3, 249-254.

Shoaib, M., Swanner, L.S., Yasar, S., and Goldberg, S.R., 1999. Chronic caffeine exposure potentiates nicotine self-administration in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 4, 327-333.

Sills, T.L., Azampanah, A., and Fletcher, P.J., 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. *Eur. J. Pharmacol.* 3, 325-329.

Solinas, M., Ferre, S., You, Z.B., Karcz-Kubicha, M., Popoli, P., and Goldberg, S.R., 2002. Caffeine induces dopamine and glutamate release in the shell of the nucleus accumbens. *J. Neurosci.* 15, 6321-6324.

Stoner, G.R., Skirboll, L.R., Werkman, S., and Hommer, D.W., 1988. Preferential effects of caffeine on limbic and cortical dopamine systems. *Biol. Psychiatry* 8, 761-768.

Svenningsson, P. and Fredholm, B.B., 2003. Exciting news about A2A receptors. *Neurology* 11 Suppl 6, S10-S11.

Thevananther, S., Rivera, A., and Rivkees, S.A., 2001. A1 adenosine receptor activation inhibits neurite process formation by Rho kinase-mediated pathways. *Neuroreport* 14, 3057-3063.

Toda, S., Alguacil, L.F., and Kalivas, P.W., 2003. Repeated cocaine administration changes the function and subcellular distribution of adenosine A1 receptor in the rat nucleus accumbens. *J. Neurochem.* 6, 1478-1484.

Tsai, G., Lane, H.Y., Yang, P., Chong, M.Y., and Lange, N., 2004. Glycine transporter I inhibitor, N-methylglycine (sarcosine), added to antipsychotics for the treatment of schizophrenia. *Biol. Psychiatry* 5, 452-456.

Tsutsui, S., Schnermann, J., Noorbakhsh, F., Henry, S., Yong, V.W., Winston, B.W., Warren, K., and Power, C., 2004. A1 adenosine receptor upregulation and activation attenuates neuroinflammation and demyelination in a model of multiple sclerosis. *J. Neurosci.* 6, 1521-1529.

Turner, C.P., Pulciani, D., and Rivkees, S.A., 2002a. Reduction in intracellular calcium levels induces injury in developing neurons. *Exp. Neurol.* 1, 21-32.

Turner, C.P., Seli, M., Ment, L., Stewart, W., Yan, H., Johansson, B., Fredholm, B.B., Blackburn, M., and Rivkees, S.A., 2003. A1 adenosine receptors mediate hypoxia-induced ventriculomegaly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 20, 11718-11722.

Turner, C.P., Yan, H., Schwartz, M., Othman, T., and Rivkees, S.A., 2002b. A1 adenosine receptor activation induces ventriculomegaly and white matter loss. *Neuroreport* 9, 1199-1204.

Ushijima, I., Katsuragi, T., and Furukawa, T., 1984. Involvement of adenosine receptor activities in aggressive responses produced by clonidine in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 4, 335-339.

Von Lubitz, D.K., Paul, I.A., Carter, M., and Jacobson, K.A., 1993. Effects of N6-cyclopentyl adenosine and 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine on N-methyl-D-aspartate induced seizures in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 3, 265-270.

Wang, J.H., Short, J., Ledent, C., Lawrence, A.J., and Buuse, M., 2003. Reduced startle habituation and prepulse inhibition in mice lacking the adenosine A2A receptor. *Behav. Brain Res* 2, 201-207.

Weisbrod, M., Gaser, C., Mohr, A., and Sauer, H., 2004. Progression of disease-specific gray matter deficits in twins discordant for schizophrenia. *Schizophr. Res* S24-

Winterer, G. and Hermann, W.M., 2000. Valproate and the symptomatic treatment of schizophrenia spectrum patients. *Pharmacopsychiatry* 5, 182-188.

Zimmermann, H., 1996. Biochemistry, localization and functional roles of ecto-nucleotidases in the nervous system. *Prog. Neurobiol.* 6, 589-618.

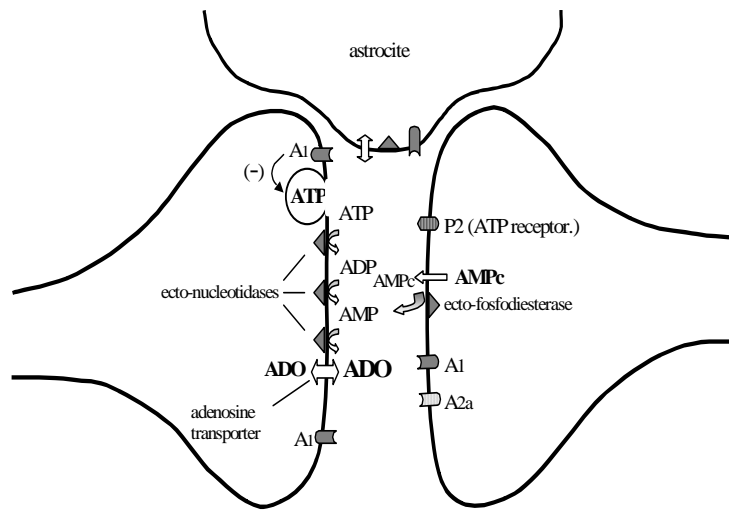


Figure 1. Purinergic system and adenosine (ADO) sources extracellular (ATP, intracellular adenosine and AMPc).

Table 1. Comparison between features of schizophrenia and roles of adenosine

Features related to schizophrenia	ROLES OF ADENOSINE OR EFFECTS OF ADENOSINE ANTAGONISTS (CAFFEINE AND THEOPHYLLINE)
<p>Increased dopaminergic activity <i>Amphetamine produces psychotic symptoms</i> Antipsychotics block D₂R</p>	<p>Adenosine inhibits dopaminergic activity Adenosine agonists reverse behavioral effects of amphetamine in animal models Caffeine-induced hyperlocomotion is blocked by D₂R antagonists Sensitization to dopamine involves decreased action of adenosine through presynaptic A1R in nucleus accumbens</p>
<p><i>Neurochemical sensitization of dopamine activity</i></p>	<p>Adenosine agonists (especially of A1R) reverse the behavioral and EEG effects induced by NMDA antagonists Adenosine A1 agonists inhibit glutamate release Low-dose NMDA (the agonist) induces adenosine release and adenosine mediated sedation</p>
<p><i>NMDA antagonists produce symptoms resembling schizophrenia, possibly related to increased glutamate release</i></p>	<p>Adenosine is neurotoxic through activation of A1R in the immature brain and the mediator of hypoxia-induced neurotoxicity. Any factor producing fetal brain energy imbalance can promote adenosine release and neurotoxicity (adenosine as a 'final common pathway' of pregnancy, birth and early neonatal complications).</p>
<p><i>Neurodevelopmental component</i></p>	<p>Adenosine is neuroprotective in several animal models A1R knockout mice are more susceptible to hypoxia, which involves excitotoxicity</p>
<p><i>Deteriorating course and progressive brain loss</i></p>	<p>Presynaptic effects of adenosine on neurotransmitter release become important only in mature synapses Reduced stimulant effect of caffeine in infants More pronounced behavioral alterations in treated ADA deficiency at adolescence compared to childhood.</p>
<p><i>Age of onset - late teens and early adulthood</i></p>	<p>Adenosine is a sleep promoter Caffeine produces global insomnia with ↓ delta activity delta at 1-2 Hz in healthy volunteers</p>
<p><i>Global insomnia of schizophrenic patients, particularly ↓ delta activity at 1-2 Hz</i> <i>Sensory gating deficit as measured with P50 evoked potential</i></p>	<p>Theophylline mimics the sensory gating deficit in healthy volunteers; adenosine is an activity-</p>

<i>(increased P50 ratio)</i>	dependent inhibitory modulator, with short-lived (< 1sec) effects under physiological neuronal stimulation
<i>Impaired performance in neuropsychological tests</i>	Moderate dose of caffeine impairs Stroop test performance
<i>Increased smoking</i>	Chronic treatment with caffeine doubles nicotine consumption and facilitates acquisition of nicotine self-administration behavior in rats
<i>Possible efficacy of ECT and TMS</i>	Neuronal stimulation promotes adenosine release
<i>Caffeine may exacerbate symptoms; dipyridamole and allopurinol treated positive symptoms of schizophrenia</i>	Caffeine blocks A1R and A2AR, dipyridamole increases extracellular adenosine and allopurinol inhibits purine degradation

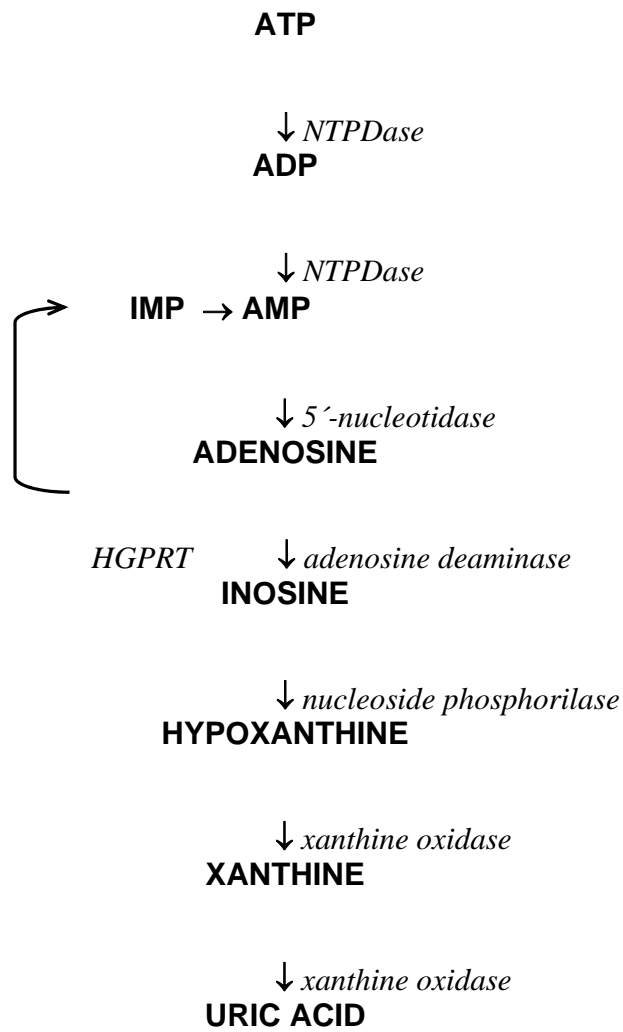


Figure 2

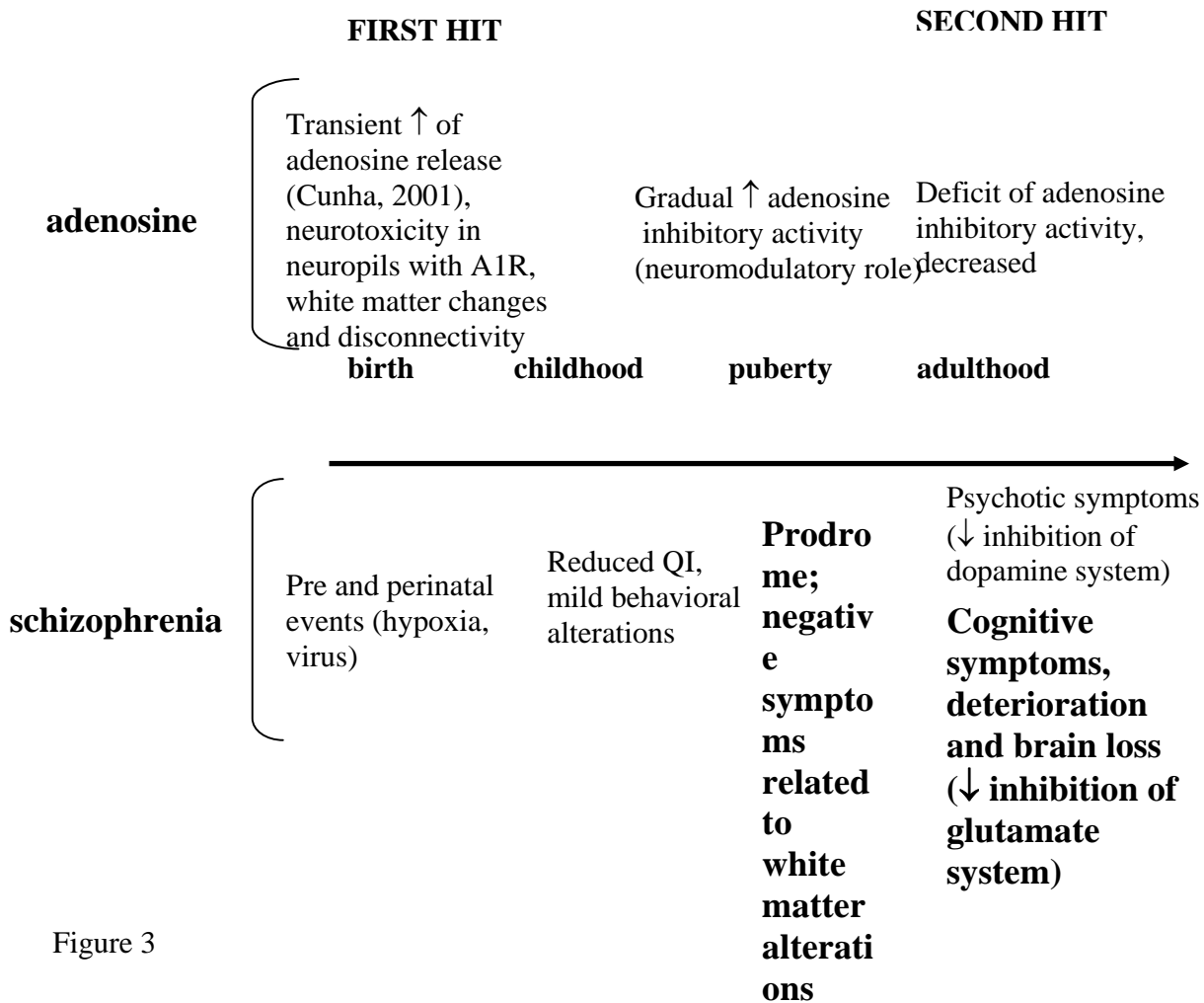


Figure 3

egends

Figure 1. Purinergic system and sources of extracellular adenosine.

ATP stored in presynaptic vesicles is released after depolarization, acting on P2 receptors and being dephosphorylated by ecto-NTPDases and ecto-5'nucleotidase (ecto-5'NT) into adenosine (ADO). ADO acts mainly on A1R and A2AR and can be converted into inosine extracellularly by ecto-adenosine deaminase (ecto-ADA) or uptaken by nucleoside transporters. Inside the cell, ADO preferentially forms AMP by adenosine kinase (AK) but also may be deaminated by ADA (not shown). The sources of extracellular adenosine are ATP, adenosine released as such by nucleoside transporters (in situation of energetic imbalance, such as brain damage), and cAMP, which is converted into AMP by an ecto-phosphodiesterase and later into ADO. A1R and A2AR are present both pre and post-synaptically. P2 are receptors for ATP.

Figure 2. Schematic representation of purine metabolism from ATP

to uric acid. ATP is degraded to hypoxanthine, which can be salvaged by hypoxanthine-guanine-phosphoribosyl-transferase (HGPRT) or further metabolized to xanthine and uric acid by xanthine oxidase. Enzymes are in italics. Guanine-based purines (GTP to guanosine, guanine and xanthine) are not illustrated.

Figure 3. Summary of the adenosine hypothesis of schizophrenia.

Proposed changes in the adenosine system (top) and characteristics of schizophrenia (bottom) as a function of age.

Parte II

Capítulo 2

CLINICAL TRIAL OF ALLOPURINOL ADJUVANT THERAPY FOR MODERATELY REFRACTORY SCHIZOPHRENIA

Status: artigo publicado

Brunstein MG, Ghisolfi ES, Ramos FL, Lara DR.

**A clinical trial of adjuvant allopurinol therapy for moderately refractory
schizophrenia.**

J Clin Psychiatry 2005; 66:213-9.

A Clinical Trial of Adjuvant Allopurinol Therapy for Moderately Refractory Schizophrenia

Miriam G. Brunstein, M.D., M.Sc.; Eduardo S. Ghisolfi, M.D., M.Sc.;
Fernanda L. Ramos; and Diogo R. Lara, M.D., Ph.D.

Objective: To evaluate the xanthine oxidase inhibitor allopurinol as an adjuvant treatment for patients with moderately refractory schizophrenia, with the objective of increasing the endogenous pool of purines, including the neuromodulator adenosine.

Method: A double-blind, placebo-controlled, crossover clinical trial of add-on allopurinol (300 mg b.i.d.) for poorly responsive schizophrenia or schizoaffective disorder (DSM-IV criteria) was conducted. Thirty-five patients were enrolled, of whom 22 completed the 12 weeks of the study. Eighteen of these patients also completed a P50 evoked potential evaluation.

Results: Allopurinol was well tolerated and produced significant improvement in Positive and Negative Syndrome Scale (PANSS) total, positive, negative, and general scores, particularly for positive symptoms compared with baseline and with placebo phase. Nine patients improved more than 20% in PANSS total score during allopurinol treatment, whereas none responded in the placebo phase. Responders had a shorter duration of illness than nonresponders. P50 auditory sensory gating failed to improve with allopurinol treatment.

Conclusions: Allopurinol was an effective and well-tolerated adjuvant treatment for poorly responsive schizophrenia, especially for refractory positive symptoms.

(*J Clin Psychiatry* 2005;66:113-119)

Clinical trials of adjuvant treatments to antipsychotics for the treatment of schizophrenia have not been successful,¹⁻³ with the exception of add-on N-methyl-D-aspartate (NMDA) co-agonists and dehydroepiandrosterone (DHEA) for negative and general symptoms.^{4,5} Nevertheless, clozapine stands as the only well-established treatment for treatment-resistant schizophrenia, with efficacy for refractory positive symptoms, but not without safety, tolerability, and cost drawbacks.⁶

Allopurinol is a xanthine oxidase inhibitor routinely used to treat hyperuricemia and gout. However, previous studies and clinical observations have suggested its potential to treat refractory epilepsy,⁷ mania,⁸ and aggressive behavior in patients with neurologic disorders⁹ and dementia.¹⁰ In a case series study, our group has also reported the efficacy of add-on allopurinol in 5 of 11 treatment-resistant schizophrenic patients with unchanged antipsychotic dosages.¹¹ This pharmacologic strategy was based on the hypoadenosinergic hypothesis for schizophrenia,^{12,13} which links the dopaminergic and glutamatergic alterations since adenosine is a neuromodulator of both systems. By inhibiting the enzyme xanthine oxidase, the last step in purine degradation to uric acid, allopurinol can promote salvage of purines, possibly increasing the pool of purines, including adenosine.

The aim of the present study was to investigate the efficacy of allopurinol as adjuvant treatment for poorly responsive schizophrenia within the framework of a randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover design. Besides symptom evaluation, a P50 evoked potential was performed as a parameter of sensory gating, which has been shown to improve during treatment with clozapine, but not other atypical antipsychotics.^{14,15}

METHOD

Subjects

Patients diagnosed with schizophrenia or schizoaffective disorder according to DSM-IV by using a diagnostic checklist were considered moderately refractory on the basis of the following criteria: (1) persistence of psychotic symptoms after 2 or more distinct periods of treatment for at least 6 weeks with 2 different antipsychotics, in doses equivalent to a minimum of 400 mg/day of chlorpromazine

Received Feb. 9, 2004; accepted July 19, 2005. From the Department of Biochemistry, Health Basic Science Institute (Instituto de Ciências Básicas da Saúde), Federal University of Rio Grande do Sul - Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Drs. Brunstein and Ghisolfi); and the Departments of Biochemistry and psychiatry, Catholic University of Rio Grande do Sul (Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul) (Drs. Ghisolfi and Lara and Ms. Ramos), Porto Alegre, Brazil

This research was supported by a grant from The Stanley Medical Research Institute. The authors are grateful to the Schizophrenic Patients' Relatives Association of Rio Grande do Sul (Associação Gaúcha de Familiares de Pacientes Esquizofrênicos e Demais Doenças Mentais [AGAFPE]) Hospital Psiquiátrico São Pedro, the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Nazareno de Abreu from Fitonfarma, and specially Prof. Diogo O. Souza.

Corresponding author and reprints: Diogo R. Lara, M.D. Av. Ipiranga, 6681-Pd 12A, Porto Alegre, RS, Brazil, 90619-900 (e-mail: drlara@puers.br).

zine,¹⁶ (2) no period of good functioning within 5 years or since onset of the disorder, and (3) a minimum Positive and Negative Syndrome Scale (PANSS)¹⁷ total score of 60. Prior to study entry, subjects had to be receiving stable treatment with optimal doses of any antipsychotic, except for clozapine, for at least 2 months and could not have abused alcohol or illicit substances during the past 6 months. Adjuvant medications such as benzodiazepines, antidepressants, and mood stabilizers (lithium, valproate, or carbamazepine) were not discontinued, and patients were encouraged to continue under the supervision of their regular psychiatrists in addition to study evaluations. Psychiatrists were informed of study conditions and could suggest early termination of the study on clinical grounds. Hematology, blood chemistry, and liver and kidney functions were assessed before entry. Patients with concurrent medical, neurologic, or other psychiatric disorders were excluded. Thirty-five patients were enrolled in the study. The institutional review board approved the study, and all subjects and a legal guardian gave written informed consent to participate.

Study Design, Drug Treatment, and Clinical Assessment

Patients who satisfied the criteria described were randomly assigned to receive, under double-blind conditions, either allopurinol 300 mg b.i.d. or placebo in identical-appearing capsules in addition to their regular psychotropic medication, which remained unaltered throughout the study. After completion of the first treatment phase for 6 weeks, patients crossed over to the alternate adjuvant treatment for another 6 weeks.

Symptoms and extrapyramidal symptoms were assessed using the PANSS¹⁷ and the Extrapyramidal Symptom Rating Scale¹⁸ at weeks 0, 3, 6, 9, and 12 by 2 board-certified psychiatrists (M.G.B. and D.R.L.) trained specifically for application of these scales, with interrater correlation of $r > 0.9$ for all scales after independent evaluation of 5 patients (not from this sample) by both raters. The same research psychiatrist evaluated each patient for the duration of the study. Patients were withdrawn from the study if any alteration in medication dosages or use of an illicit drug of abuse occurred. Compliance was estimated by counting remaining capsules (at least 80% of the capsules had to be taken) every 3 weeks and retrospectively by uric acid determination at baseline and 6 and 12 weeks. Patients were also encouraged to be assessed at weeks 0, 6, and 12 for the P50 auditory evoked potential.

Electrophysiologic Recordings

The method for electrophysiologic recordings of the P50 evoked potential was as described by our group in a previous work that replicated the classical findings for schizophrenia.¹⁹ In brief, subjects were recorded seated,

relaxed, and awake with eyes open. Electroencephalographic (EEG) activity was recorded from a disk electrode affixed to the vertex (Cz) and referenced to both ears. Electroencephalogram was provided using a Nihon Kohden MEM-4104K system (Nihon Kohden; Tokyo, Japan) in 4 channels for recording of evoked responses integrated with auditory stimulator. The mean signal was registered in 2 channels, one for each side of the cranium, and amplified 20,000 times with a bandpass filter between 10 Hz and 10 kHz. EEG data were collected for 1000 ms for each paired stimulus presented. Additional channels were used to record the electrooculogram (EOG) between the superior orbita and lateral canthus. Trials were rejected if they contained artifacts indicated by an EEG tension of $\pm 100 \mu\text{V}$ over the area of P50 for evoked potentials or the EOG recordings.

Auditory stimuli were presented in a conditioning-test paradigm with an interpair interval of 500 ms and inter-trial interval of 10 seconds. A 0.1-ms square wave pulse was amplified in the auditory frequencies (20-12,000 Hz) and delivered through earphones that produce 1 ms of sound with an intensity of 60 dB sound pressure level over the auditory acuity threshold. Thirty non-rejected waves were added together to give a grand average signal, which was used for analysis. Two grand average waves were collected in sequence, and the mean of both was considered for analysis. The most positive peak between 40 and 90 ms after the conditioning stimulus was selected as the P50 final latency, and the wave amplitude (S_1) was measured relative to the previous negativity, determining the initial latency and the first P50 wave. The second wave (test) was determined using the corresponding peak, almost always between 500 ± 10 ms away from latency of the first wave form (conditioning), and its amplitude (S_2) was also measured relative to the previous negative peak.

Recordings were made and tracings were analyzed by a blinded researcher (E.S.G.), so that the test peaks that were away from the predicted interval (approximately 5%) were not overlooked. Averages with no discernible conditioning P50 waves were excluded from analysis. P50 ratios were calculated by dividing the test by the conditioning P50 amplitudes (S_2/S_1), thus representing a percentage.

Statistical Analysis

Treatment response for each treatment phase was defined as more than 20% improvement in PANSS scores compared with baseline (week 0) for the first treatment assigned and compared with the last evaluation before crossover (week 6) for the second treatment. To be considered for analysis, patients had to complete at least 9 weeks of the trial. Baseline comparisons between groups were performed using the t test for continuous variables and the Fisher exact test for categorical variables. Primary outcome analysis consisted of separate repeated-measures

Table 1. Baseline Characteristics of Patients Assigned to Allopurinol or Placebo First^a

Characteristic	Allopurinol First (N=12)	Placebo First (N=11)	p
Sex, N, male/female	7/5	7/4	.99
Age, y	35.3 ± 9.1	42.3 ± 12.9	.14
Duration of illness, y	18.3 ± 8.7	24.2 ± 11.3	.18
Antipsychotic dose, mg/d	550 ± 270	545 ± 408	.97
PANSS score			
Total	82.3 ± 14.3	83.5 ± 15.4	.85
Positive symptoms	23.4 ± 4.9	20.5 ± 5.2	.17
Negative symptoms	21.1 ± 5.8	25.1 ± 7.7	.16
General symptoms	37.8 ± 6.1	37.9 ± 7.7	.98
Uric acid, mg/dL	4.4 ± 1.6	5.0 ± 2.1	.48

^aValues are shown as mean ± SD unless otherwise noted.

Abbreviation: PANSS - Positive and Negative Syndrome Scale.

multivariate analyses of variance (MANOVAs) for total, positive, negative, and general PANSS scores. Secondary analysis evaluated (1) absolute and relative (percentage) change in PANSS scores during treatment with allopurinol or placebo, considered independently; (2) total score changes for the first phase of treatment only, compared using a t test with the last observation carried forward (LOCF); and (3) relationships between baseline characteristics in responders versus nonresponders, analyzed using t tests. The P50 ratio was analyzed with the Friedman test. Statistical analysis (2-tailed) was performed using the SPSS 11.0 for Windows program (SPSS Inc., Chicago, Ill.), and an alpha level of .05 was used for tests of significance. Values are reported as mean ± SD.

RESULTS

Thirty-five patients (26 outpatient and 9 institutionalized patients, 33 with schizophrenia and 2 with schizoaffective disorder) were enrolled and 22 (15 and 7 patients, respectively) completed the study. One outpatient who responded to allopurinol dropped out at week 9 (week 3 of placebo treatment) due to symptom worsening and was included in the analysis. Eighteen patients completed the P50 evoked potential evaluation. Three patients dropped out because of adverse events: seizures in a patient at the fourth week of placebo, pneumonia in a patient at the fourth week of allopurinol treatment, and skin rash in a patient at the second week of allopurinol treatment. Among those patients who started on placebo treatment, 5 dropped out due to lack of efficacy. During the allopurinol treatment phase, 1 patient used cannabis, 1 discontinued antipsychotic treatment, and 2 dropped out due to lack of efficacy.

Among the 23 patients included in the analysis, 1 patient was receiving a depot antipsychotic, 10 were taking atypical antipsychotics (risperidone or olanzapine), and 12 were receiving typical antipsychotics. Seven patients were taking only antipsychotics with or without concurrent anticholinergic medication, whereas 5 were also be-

Table 2. Changes in PANSS Total, Positive, Negative, and General Symptom Scores After Treatment With Allopurinol or Placebo (mean ± SD)

Group	Total	Positive	Negative	General
Allopurinol (N = 23)				
Change	-12.0 ± 10.0 ^{a,b}	-5.0 ± 4.5 ^{a,b}	-2.0 ± 2.6 ^{a,b}	-5.0 ± 4.9 ^{a,b}
% Change	-15 ± 12 ^a	-21 ± 17 ^a	-8 ± 13 ^a	-13 ± 13 ^a
Placebo (N = 23)				
Change	3.6 ± 11.3	0.8 ± 5.1	1.2 ± 2.6	1.6 ± 4.8
% Change	7 ± 20	11 ± 42	7 ± 16	7 ± 17
Allopurinol first (N = 12)				
Change	-14.1 ± 10.7	-6. ± 5.1	-1.8 ± 2.9	-6.1 ± 4.8
% Change	-18 ± 14 ^b	-26 ± 19 ^b	-9 ± 16	-18 ± 13 ^b
Allopurinol second (N=11)				
Change	-9.1 ± 8.8	-3.7 ± 3.5	-2.1 ± 2.3	-3.3 ± 4.6
% Change	-10 ± 10 ^b	-16 ± 14 ^b	-7 ± 9 ^b	-8 ± 11
Placebo first (N=11)				
Change	2.8 ± 7.1	0.5 ± 2.7	1.5 ± 2.8	0.8 ± 2.9
% Change	5 ± 11	4 ± 15	9 ± 17	3 ± 22
Placebo second (N = 12)				
Change:	4.3 ± 14.4	1.2 ± 6.8	0.8 ± 2.5	2.3 ± 6.2
% Change	9 ± 26	16 ± 56	5 ± 9	10 ± 11

^a Different from mean placebo response (p < .01, paired t test).

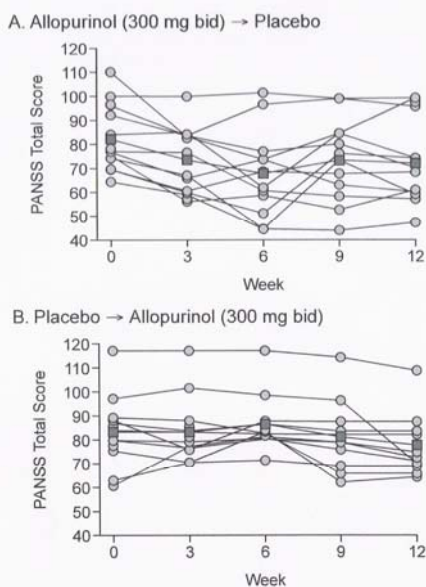
^b Different from placebo phase within the same subjects (p < .05, paired t test).

Abbreviation: PANSS = Positive and Negative Syndrome Scale.

ing treated with benzodiazepines, 4 with antidepressants, and 9 with mood stabilizers. Table 1 shows baseline demographic and clinical characteristics of the sample that completed the study. The group starting on allopurinol treatment had a statistically nonsignificant lower age, shorter duration of illness by around 6 years, and lower negative and higher positive symptom scores.

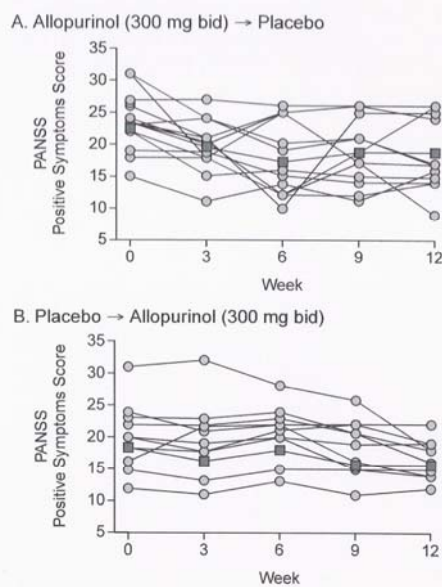
Regarding symptoms, allopurinol treatment was associated with significant clinical improvement as shown in Table 2 for the different symptom domains and treatment orders. Response was particularly evident for positive symptoms. Figures 1 and 2 show PANSS total and positive symptoms, respectively, of all patients. Numbers of treatment responders (PANSS score reduction > 20%) after 6 weeks of treatment with allopurinol and placebo, respectively, were 9/0 for PANSS total score, 11/2 for positive symptoms, 4/0 for negative symptoms, and 8/0 for general symptoms subscale scores. Repeated-measures MANOVA performed with within-subject factors of treatment phase (placebo/allopurinol) and week of treatment (0, 3, and 6 weeks) revealed highly significant treatment effects after allopurinol treatment for total (F = 18.9, df = 2, 44; P < .001), positive (F = 17.6, df = 2, 44; p < .001), negative (F = 8.4, df = 2, 44; p < .001), and general (F = 14.8, df = 2, 44; p < .001) symptoms PANSS scores, but not after placebo treatment (F < 2.5, df = 2, 44; p > .1 for all symptom scores). Numbers of responders to al-

Figure 1. PANSS Total Scores in Patients Who Received (A) Allopurinol Followed by Placebo (N = 12) or (B) Placebo Followed by Allopurinol (N = 11), With Crossover at Week 6*



*Squares show mean scores. Abbreviation: PANSS = Positive and Negative Syndrome Scale.

Figure 2. PANSS Positive Symptom Scores in Patients Who Received (A) Allopurinol Followed by Placebo (N = 12) or (B) Placebo Followed by Allopurinol (N = 11), With Crossover at Week 6*



*Squares show mean scores. Abbreviation: PANSS = Positive and Negative Syndrome Scale.

lopurinol in the group starting on allopurinol treatment compared with those starting on placebo treatment were 7/2 for total, 7/4 for positive, 3/1 for negative, and 6/2 for general symptoms scores (see also Table 2), without reaching statistical significance.

Secondary analysis showed significant symptom change after 6 weeks of allopurinol compared with placebo treatment for all symptom scores in terms of both absolute and relative symptom scores ($p < .01$, t test for all scores) (Table 2). Moreover, if calculation of the percent reduction in PANSS scores takes into account the fact that items on this scale are scored 1 for absence of symptoms, total and positive symptoms improved 23% and 31% during allopurinol and worsened 18% and 24% during placebo treatment, respectively. The LOCF analysis of the first phase of treatment including all patients enrolled showed a decrease of 11.0 ± 10.3 in total PANSS score (-14%) with allopurinol compared with an increase of 0.2 ± 8.3 (0.2%) with placebo ($p < .001$; both groups had mean baseline PANSS scores of 86).

Comparison of baseline characteristics of responders and nonresponders showed that responders tended to be younger (33 ± 11 and 42 ± 10 years, $p = .056$) and had a shorter duration of illness (15 ± 10 and 25 ± 9 years, $p = .03$). Among institutionalized patients, who were

older and had a longer duration of the disorder, only 1 responded to allopurinol therapy. Clear worsening of symptoms was not observed in any patient during the allopurinol phase. Three patients experienced relapse of symptoms, whereas other responders seemed to remain less symptomatic after switching from allopurinol to placebo. Six of the 9 responders were taking adjuvant medication besides anticholinergics, and 4 responders were receiving atypical antipsychotics.

Regarding adverse events, extrapyramidal symptoms were not altered throughout the study (data not shown), and only 1 patient experienced diarrhea in the first week of treatment with allopurinol. As expected, uric acid levels decreased for all patients during allopurinol treatment compared with baseline and placebo levels (baseline 4.5 ± 1.7 mg/dL, placebo 4.9 ± 1.6 mg/dL, allopurinol 2.2 ± 0.9 mg/dL, $p < .001$), suggesting compliance with treatment. However, baseline uric acid levels and decline of uricemia after allopurinol treatment were not correlated to clinical response. The P50 ratio was $79.8 \pm 36.7\%$ at baseline, $61.9 \pm 27.0\%$ after allopurinol treatment, and $64.7 \pm 48.4\%$ after placebo treatment, without statistical significance ($p = .08$, Friedman test). Moreover, clinical response was not correlated with P50 ratio decline.

DISCUSSION

The present clinical trial suggests that add-on allopurinol can be effective for treating schizophrenia patients with poor response to antipsychotics. Response was more evident for refractory positive symptoms and in younger patients with a shorter course of the disorder. These results corroborate our previous open observation¹¹ in treatment-resistant schizophrenia. Moreover, allopurinol was well tolerated, with only 1 patient excluded due to the adverse event of skin rash, which can occur in around 3% of patients.²⁰ Apart from this, other side effects with allopurinol are rare and include leukocytosis, eosinophilia, and elevation of aminotransferase activity, which may require discontinuation of treatment.²⁰

Compared with earlier trials, our study used less stringent inclusion criteria for refractory schizophrenia, similarly to other recent studies.^{21,22} Although many patients had a history of treatment with more than 2 antipsychotics of different classes at high doses, the 400-mg minimum dose of chlorpromazine equivalents was established as the lower limit. This dose was used because in clinical practice there has been a trend for use of lower doses of typical antipsychotics since higher doses usually increase adverse events (e.g., extrapyramidal symptoms) rather than clinical response,²³ which is in agreement with D2 receptor occupancy data.²⁴ Nevertheless, our sample had a clinically significant level of positive symptom psychopathology despite the mean dose of 550 chlorpromazine equivalents, which implies that these patients were not undertreated with antipsychotics at baseline.

Another difference from other trials of this type was that in this trial other adjuvant medications were allowed, such as benzodiazepines, mood stabilizers, and antidepressants; this facilitated inclusion of the treatment refractory subtype of patients, who are frequently treated with such medications due to their poor response to antipsychotics, despite questionable results. As a result, our sample is relatively heterogeneous, which may be more representative of the clinical setting at the expense of reducing internal validity.

Treatment response was observed regardless of ongoing treatment concerning type of antipsychotic or use of other adjuvant medications. Pharmacokinetic interactions with allopurinol leading to higher plasma concentrations 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 higher doses of antipsychotics are unlikely to produce further improvement.²³ Moreover, many of these patients had been receiving higher doses of antipsychotics before without clear benefit, and extrapyramidal symptoms were not altered by treatment with allopurinol. In addition, the 600-mg dose of allopurinol is above the usual dose of 300 mg/day for treatment of gout but re-

mained well tolerated. In our previous open-label studies with schizophrenia¹¹ and dementia,¹⁰ we have observed some patients who responded better to this higher dose, which might reflect the somewhat lower distribution of allopurinol in brain tissue.²⁰

There are advantages and inconveniences inherent to the crossover design used in this study. This strategy is suitable to study chronic conditions, and analysis is performed "within" rather than "between" subjects; therefore, the sample size needed is smaller and evaluation is more homogenous. It can be argued that the crossover design and the maintenance of the medication regimen during the trial minimize biases related to the presence of concomitant medication. The limitations of this design involve the dropout rate, a period effect, and a carryover effect. In this study, the dropout of 12 of 35 patients receiving both treatments is reasonable, and there was a trend toward lower response in the second period of treatment. A carryover of treatment effect seemed to occur in certain patients who responded to allopurinol as the first treatment. Additionally, this effect seemed to last more than 6 weeks, so an interval between treatments of 1 or 2 weeks probably would not have fully prevented this effect. Finally, the lack of a washout period between phases permits that worsening of symptoms due to withdrawal of the first treatment could have been detected and included in the analysis. This seemed to be the case for at least 3 patients who started on allopurinol treatment and in none who started on placebo treatment, therefore leading to a mean increase in PANSS scores during the placebo phase.

To our knowledge, the first report of treatment of psychiatric symptoms with allopurinol was in neurologic patients with refractory aggressive behavior.⁹ The rationale was that Lesch-Nyhan syndrome is an inborn neurologic disorder of purine salvage deficit leading to increased purine degradation, which is associated with severe aggressive behavior and mental retardation. Since allopurinol inhibits the enzyme xanthine oxidase, the last step in purine degradation to uric acid, salvage of purines would be enhanced and produce an antiaggressive effect. In the case of schizophrenia, an activity deficit of the purine nucleoside adenosine has been proposed to contribute to the pathophysiology of schizophrenia,^{12,13} and enhancement of adenosine activity has been suggested as a target for therapeutic intervention.²⁵ Adenosine is a neuromodulator of the purinergic system with mainly inhibitory actions in the central nervous system²⁶ through widespread A1 receptors and mesolimbic-striatal A2A receptors, which are co-localized with D2 receptors.²⁵ Preclinically, adenosine analogs exert antipsychotic,²⁵ anxiolytic, sedative, anticonvulsant,²⁶ and anti-aggressive effects.²⁷ Adenosine A1 and A2A receptor agonists have a clear preclinical antipsychotic profile in dopaminergic and glutamatergic models,^{25,28-30} and recently a cross tolerance between the adenosine receptor antagonist caf-

feine and an NMDA receptor antagonist was reported in mice.³¹ Of note, activation of A1 receptors strongly inhibits glutamate release,²⁶ a key step underlying the effects of NMDA antagonists,³² and activation of NMDA receptors induced adenosine release in the hippocampus,³³ probably from inhibitory interneurons, and in the striatum.³⁴ Moreover, slow-wave sleep alterations observed in schizophrenia³⁵ are qualitatively similar to those induced by the adenosine antagonist caffeine in healthy subjects,³⁶ and theophylline, another adenosine receptor antagonist, induces P50 evoked potential deficit in normal volunteers that closely resembles the sensory gating alterations of schizophrenia.⁹ Unfortunately, safe and tolerable direct adenosine agonists are not yet available for clinical use in humans. Recently, the combination of haloperidol with the inhibitor of adenosine transporter dipyridamole was superior to the combination with placebo in schizophrenic patients.³¹ In this context, allopurinol is hypothesized to increase availability of purines by inhibiting the enzyme xanthine oxidase, which converts hypoxanthine and xanthine into uric acid. The accumulation of hypoxanthine and xanthine may favor the enzyme hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HGPRT), which is responsible for purine salvage,³⁸ possibly increasing the levels of the neuromodulator adenosine.^{7,9,39} However, according to this model, we would expect an effect of allopurinol on the P50 auditory sensory gating.

Several lines of evidence also suggest a neuroprotective effect of allopurinol.⁴⁰ In animal models of hypoxic-ischemic brain injury, allopurinol attenuated brain cell membrane injury,⁴¹ reduced the extent of cerebral edema,^{42,43} preserved levels of compounds involved in energetic metabolism such as adenosine triphosphate,⁴⁴ decreased the accumulation of arachidonic acid,⁴⁵ and improved the recovery of somatosensory evoked potentials during reperfusion.⁴⁶ These effects are at least partially attributed to the antioxidant activity of allopurinol, since the reaction catalyzed by xanthine oxidase generates reactive oxygen species.⁴⁰ Moreover, allopurinol significantly attenuated hypoxia-induced alterations of glutamatergic NMDA receptors (down-regulation and increased channel affinity), which is particularly important considering that excessive stimulation of the NMDA receptors leads to neuronal injury and degeneration.⁴⁷ Finally, chronic inhibition of xanthine oxidase is unlikely to be problematic, as the genetic disorder of inactive xanthine oxidase activity, xanthinuria, is asymptomatic.³⁹

In summary, this clinical trial indicates allopurinol as an effective adjunctive treatment strategy for poorly responsive schizophrenia, with advantages in cost, tolerability, availability, and potentially neuroprotective action. Given the paucity of the existing alternatives to treat refractory schizophrenia, the positive results of this new pharmacologic approach, and the limitations in sample

size and design, independent replication in larger series of patients is warranted.

Drug names: allopurinol (Lopurin, Zyl oprim, and others), carbamazepine (Carbatrol, Tegretol, and others), chlorpromazine (Thorazine, Sonazine, and others), clozapine (Clozaril, Fazaclo, and others), haloperidol (Haldol and others), lithium (Lithobid, Eskalith, and others), olanzapine (Zyprexa), risperidone (Risperdal).

REFERENCES

1. Jungerman T, Rabinowitz D, Klein E. Deprenyl augmentation for treating negative symptoms of schizophrenia: a double-blind, controlled study. *J Clin Psychopharmacol* 1999; 19: 522-525.
2. Hesslinger B, Normann C, Langosch JM, et al. Effects of carbamazepine and valproate on haloperidol plasma levels and on psychopathologic outcome in schizophrenic patients. *J Clin Psychopharmacol* 1999; 19: 310-315.
3. Schulz SC, Thompson PA, Jacobs M, et al. Lithium augmentation fails to reduce symptoms in poorly responsive schizophrenic outpatients. *J Clin Psychiatry* 1999; 60:366-372.
4. Heresco-Levy U, Javitt DC, Ermilov M, et al. Efficacy of high-dose glycine in the treatment of negative symptoms of schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 1999; 56:29-36.
5. Strous RD, Maayan R, Lapidus R, et al. Dehydroepiandrosterone augmentation in the management of negative, depressive, and anxiety symptoms in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 2003; 60:133-141.
6. Chakos M, Lieberman J, Hoffman E, et al. Effectiveness of second-generation antipsychotics in patients with treatment-resistant schizophrenia: a review and meta-analysis of randomized trials. *Am J Psychiatry* 2001; 158:518-526.
7. Zagnoni PG, Bianchini A, Zolo P, et al. Allopurinol as add-on therapy in refractory epilepsy: a double-blind placebo-controlled randomized study. *Epilepsia* 1994; 35:107-112.
8. Machado-Vieira R, Lara DR, Souza DO, et al. Therapeutic efficacy of allopurinol for mania associated to hyperuricemia [letter]. *J Clin Psychopharmacol* 2001; 21:621-22.
9. Lara DR, Belmonte-de-Abreu P, Souza DO. Allopurinol for the treatment of refractory aggression and self-inflicted behavior. *J Psychopharmacol* 2000; 14:81-83.
10. Lara DR, Cruz MR, Xavier F, et al. Allopurinol for the treatment of aggressive behaviour in patients with dementia. *Int Clin Psychopharmacol* 2003; 18:53-55.
11. Lara DR, Brunstein MG, Ghisolfi ES, et al. Allopurinol augmentation for poorly responsive schizophrenia. *Int Clin Psychopharmacol* 2001; 16:235-237.
12. Lara DR, Souza DO. Schizophrenia: a purinergic hypothesis. *Med Hypotheses* 2000; 54: 157-166.
13. Lara DR. Inhibitory deficit in schizophrenia is not necessarily a GABAergic deficit. *Cell Mol Neurobiol* 2002; 22:239-247.
14. Nagamoto HT, Adler LE, Hea RA, et al. Gating of auditory P50 in schizophrenics: unique effects of clozapine. *Biol Psychiatry* 1996; 40: 181-188.
15. Adler LE, Cawthrd. EM, Nagamoto HT, et al. Atypical antipsychotics differ in effect on P50 auditory sensory gating [abstract]. *Schizophr Res* 2003;60(suppl 1):S248.
16. American Psychiatric Association. Treatment Guidelines for the Treatment of Patients With Schizophrenia. *Am J Psychiatry* 1997;154(suppl 4): 1-63.
17. Kay SR, Fiszbein A, Qpler LA. The Positive and Negative Syndrome Scale (PANSS) for schizophrenia. *Schizophr Bull* 1987;13:261-276.
18. Chouinard G, Ross- Chouinard A, Annable L, et al. The Extrapyramidal Symptom Rating Scale [abstract]. *Can J Neurol Sci* 1980;7:233.
19. Ghisolfi ES, Prkopiuk AS, Becker J, et al. The adenosine antagonist theophylline impairs P50 auditory sensory gating in normal subjects. *Neuropsychopharmacology* 2002;27:629-637.
20. Roberts LJ II, Morrow JD. Analgesic-antipyretic and antiinflammatory agents and drugs employed in the treatment of gout. In: Hardman JG, Limbird LE, Gilman AG, ed. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. Tenth Edition New York, NY: McGraw-Hill; 2001:687-731.
21. Kane JM, Marder SR, Schooler NR, et al. Clozapine and haloperidol in moderately refractory schizophrenia: a 6-month randomized and double-

- blind comparison. Arch Gen Psychiatry 2001; 58:965-972
22. Rodriguez-Perez V, Lopez A, Blanco C, et al. Olanzapine for the treatment of chronic refractory schizophrenia: a 12-month follow-up naturalistic study. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 2002; 26:1055-1062
 23. Mossman D. A decision analysis approach to neuroleptic dosing: insights from a mathematical model J Clin Psychiatry 1997; 58:66-73
 24. Kapur S, Seeman P. Does fast dissociation from the dopamine D2 receptor explain the action of atypical antipsychotics? a new hypothesis. Am J Psychiatry 2001; 158: 360-369
 25. Ferré S. Adenosine-dopamine interactions in the ventral striatum: implications for the treatment of schizophrenia. Psychopharmacology (Berl) 1997; 133:107-120
 26. Ralencic V, Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines. Pharmacol Rev 1998; 50:413-492
 27. Ushijima I, Katsuragi T, Furukawa T. Involvement of adenosine receptors activities in aggressive response produced by clonidine in mice. Psychopharmacology (Berl) 1984; 83:335-339
 28. Brown RG, Welch WM. Stereoselective antagonism of phencyclidine's discriminative properties by adenosine receptor agonists. Science 1982; 217: 1157-1159
 29. 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; 333:143-146
 30. Andin P, Widemark N, Axelsson R, et al. Characterization of MK-801-induced behavior as a putative rat model of psychosis. J Pharmacol Exp Ther 1999; 290:1393-1408
 31. Dall'igna Op, Da Silva AI., Dietrich MO, et al. Chronic treatment with caffeine blunts the hyperlocomotor but not cognitive effects of the *N*-methyl-D-aspartate receptor antagonist MK-801 in mice. Psychopharmacology (Berl) 2003; 166:258-263
 32. Moghaddam B, Adams B, Verma A, et al. Activation of glutamatergic neurotransmission by ketamine: a novel step in the pathway from NMDA receptor blockade to dopaminergic and cognitive disruptions associated with the prefrontal cortex. J Neurosci 1997; 17:2921-2927
 33. Manzoni OJ, Manabe T, Nicoll RA. Release of adenosine by activation of NMDA receptor in the hippocampus. Science 1994; 265:2098-2101
 34. Craig CG, White ID. *N*-methyl-D-aspartate and non *N*-methyl-D-aspartate-evoked adenosine release from rat cortical slices: distinct purinergic and mechanisms of release J Neurochem 1993 ;60: 1 073-1 080
 35. Keshavan MS, Reynolds CF III, Miewald MJ, et al. Delta sleep deficits in schizophrenia. Arch Gen Psychiatry 1998; 55:443-448
 36. Landlolt HP, Dijk D, Gaus SE, et al. Caffeine reduces low-frequency delta activity in the human sleep EEG. Neuropharmacology 1995; 12:229-238
 37. Akhondzadeh S, Shasavand E, Jamilian Hi, et al. Dipyridamole in the treatment of schizophrenia: adenosine-dopamine receptor interaction. J Clin Pharm Ther 2000; 25: 131-137
 38. Nyhan WL. The recognition of Lesch-Nyhan syndrome as an inborn error of purine metabolism. J Inher Metab Dis 1997; 20: 171-178
 39. Mateos FA, Puig JG, Jimenez MI, et al. Hereditary xanthinuria: evidence for enhanced hypoxanthine salvage. J Clin Invest 1987; 79:347-2
 40. Harrison R. Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? Free Radic Biol Med 2002; 33:774-797
 41. Marro PJ, McGowen J, Razdan B, et al. Effect of allopurinol on uric acid levels and brain cell membrane Na,K-ATPase activity during hypoxia in newborn piglets. Brain Res 1994; 650:9-15
 42. Patt A, Harken AH, Burton LK, et al. Xanthine oxidase-derived hydrogen peroxide contributes to ischemia-reperfusion-induced edema in gerbil brains. J Clin Invest 1988; 81:1556-1562
 43. Palmer C, Vannucci RC, Towryhi I. Reduction of perinatal hypoxic-mic Inin clamage with allopurinol. Pcdiat Res 1990; 27:332-336
 44. Williams GD, Palmer C, Heitjan DF, et al. Allopurinol preserves cerebral energy metabolism during perinatal hypoxia ischemia: a 31 P NMR study in unanesthetized immature rats. Neurosci Lett 1992; 144:103-106
 45. Pigon JP, Donovan OL, Fink JA, et al. Experimental pharmacologic cerebral protection. J Vasc Surg 1988; 7:630-635
 46. Mink RB, Dutka AJ, Hallenbeck JK. Allopurinol pre-treatment improves evoked response following global cerebral ischemia in dogs. Stroke 1991 ;22:660 665
 47. Farber NB, Newcomer JW, Olney JW. The glutamate synapse in the neuropsychiatric disorders: focus on schizophrenia and Alzheimer's disease. Prog Brain Res 1998; 116:421-437

Parte III

Discussão

DISCUSSÃO

O entendimento dos processos neuropatológicos da esquizofrenia e o seu tratamento seguem desafiadores apesar de avanços importantes realizados nas últimas décadas. O aprimoramento tecnológico, em especial dos estudos de imagem anatômica e funcional, permitiu aprofundar o conhecimento da estrutura e funcionamento do sistema nervoso central. Assim, foi possível documentar alterações macro e microscópicas do tecido cerebral, conhecer mais sobre as redes de conexão neural e suas intercomunicações, buscar genes candidatos, postular novos modelos de patofisiologia e propor novas abordagens terapêuticas (Abi-Dargham e Laruelle, 2005; Buchanan e Carpenter, 2005; Sawa e Snyder 2002; Tamminga, 1998). Dentro deste contexto, o estudo do sistema glutamatérgico em esquizofrenia foi um avanço significativo, que ressaltou a importância do envolvimento de múltiplos sistemas de neurotransmissão nesta síndrome complexa. Vários aspectos do modelo glutamatérgico têm sido relevantes na pesquisa e clínica desta área, sobretudo na busca de novas opções terapêuticas (Abi-Dargham e Laruelle, 2005; Buchanan e Carpenter, 2005). Drogas que atuam neste sistema como os agonistas de glicina e drogas que atuam modulando glutamato, ao menos como um aspecto de seu mecanismo de ação, lamotrigina e topiramato, têm trazido resultados interessantes como tratamento adjuvante (Tsai, 2004; Heresco-Levy, 2003; Tiihonen, 2003 Anand et al, 2000). Os pacientes tratados com essas drogas apresentam melhora de sintomas, em especial sintomas negativos e cognitivos, no entanto, sua eficácia ainda vem sendo avaliada. Outras abordagens farmacoterapêuticas como drogas

que atuam em GABA (Wolkowitz et al, 1002), por exemplo, têm se mostrado ainda mais limitadas.

Desde as descobertas casuais da clorpromazina na década de 50 e da clozapina na década de 70, do século passado, a terapia farmacológica da esquizofrenia não avançou de forma impactante. A indústria farmacêutica, desde então, vem apenas buscando desenvolver compostos baseados nos mecanismos de ação destas drogas. Assim, os antipsicóticos de segunda geração tem um perfil mais favorável no que se refere a efeitos colaterais e tratamento de sintomas cognitivos ou negativos, sem uma eficácia claramente superior (Buchanan e Carpenter, 2005). Além disso, há muito a se avançar nas estratégias terapêuticas que modifiquem o curso da doença ou que funcionem para todos os casos. Sendo assim, novos modelos de entendimento da neuropatologia da esquizofrenia e novas estratégias de intervenção farmacológica são bem-vindas.

A adenosina, apesar de seu papel central em diversas funções do sistema nervoso como neuroproteção e neuromodulação vem sendo sistematicamente esquecida na psiquiatria (Fredholm et al, 2005; Cunha, 2001; Dunwiddie e Masino, 2001). Uma das possíveis explicações seria de que os modelos clássicos para o entendimento da esquizofrenia estão baseados no efeito de drogas como as que atuam nos sistemas dopaminérgico e glutamatérgico (Buchana e Carpenter, 2005; Domino et al, 2004), outra seria de que não existem, no momento, drogas psicotrópicas que atuem no sistema purinérgico de forma potente para uso terapêutico em humanos (Dunwiddie e Masino, 2001) . Além disso, o fato da cafeína, um antagonista fraco dos receptores de adenosina, ser a droga psicoativa mais consumida no mundo pode estar influenciando para que o sistema

purinérgico seja subestimado em seu potencial envolvimento nos mecanismos patológicos das doenças psiquiátricas (Fredholm et al, 1999). No entanto, em modelos animais os análogos de adenosina apresentam efeito do tipo antipsicótico (Ferre, 1997), ansiolítico, sedativo e antiagressivo (Ushijima et al, 1984). Em particular, agonistas dos receptores A1 e A2a apresentam um perfil claramente antipsicótico tanto em modelos glutamatérgicos como dopaminérgicos (Andin et al, 1999; Ferre, 1997; Popili et al, 1997; Browne e Welch, 1982).

O modelo de disfunção purinérgica proposto em 2000 por Lara e Souza (Lara e Souza, 2000) apontava que a hipofunção de adenosina era compatível com muitos sintomas da esquizofrenia, assim como alterações do sono e início dos sintomas no final da adolescência. Porém, não propunha um mecanismo pelo qual esse déficit poderia ocorrer ou sugeria um fármaco que pudesse ser usado no tratamento da esquizofrenia.

Alterações de citoarquitetura cerebral e alterações em circuitos neurais são evidências de alterações do neurodesenvolvimento em pacientes com esquizofrenia. A desorganização do SNC ocorreria durante o período gestacional, no segundo trimestre ou no primeiro ano de vida (Lewis e Levitt, 2002) induzido por algum evento como hipóxia ou infecção viral (Bullmore et al, 1997). O mecanismo usualmente proposto é de excitotoxicidade induzida pelo glutamato (Heresco-Levy, 2003; Tamminga, 1998; Goff, 2001). Esse mecanismo parece ser responsável por lesões induzidas por glutamato em cérebro adulto, porém não parece ser o caso para cérebro em desenvolvimento. Turner et al, em 2002, demonstraram o efeito neurotóxico da adenosina no cérebro imaturo, que contrasta com seu efeito neurprotetor em cérebro maduro. Além disso, seus

resultados sugerem fortemente que a adenosina, agindo nos receptores A1, seria o fator necessário e suficiente para neurotoxicidade induzida por hipóxia nesta fase. Já que insultos como hipóxia, infecções, convulsões e trauma levam a um aumento da adenosina (Fredholm et al 2005; Cunha, 2001), resultante da quebra de ATP, a adenosina parece ser a via comum de morte neuronal no cérebro imaturo. Assim, nesta tese propusemos que a adenosina seria a substância mediadora do dano neural precoce, base das alterações de neurodesenvolvimento em esquizofrenia.

Além disso, a adenosina é um neuromodulador de sistemas de neurotransmissão classicamente envolvidos na neurobiologia da esquizofrenia como os sistemas dopaminérgico, serotoninérgico, glutamatérgico, colinérgico, noradrenérgico e GABAérgico (Fredholm et al 2005; Cunha, 2001; Brundage e Dunwinddie, 1997).

A partir do estudo do sistema purinérgico, elaboramos a hipótese de que seria possível aumentar adenosina de forma indireta através da inibição de sua degradação pelo alopurinol, uma vez que fármacos agonistas adenosinérgicos não estão disponíveis para uso em humanos por seus efeitos periféricos (Cunha, 2001). Essa hipótese pareceu promissora com os resultados do estudo aberto realizado por nosso grupo em 2001 (Lara et al, 2001), quando observamos que a introdução de alopurinol ao esquema antipsicóticos em uso por pacientes refratários melhorava de forma significativa, por vezes dramática, seu quadro clínico. Em 1974, Coleman (Coleman, 1974) havia relatado o caso de um menino de 13 anos com diagnóstico de esquizofrenia e aumento de ácido úrico que havia apresentado uma melhora bastante impressionante pelo uso de alopurinol em

monoterapia. O caso foi estudado de forma sistemática e o paciente recebeu alopurinol por 8 meses de maneira cega para o médico assistente e familiares e pelos 8 meses seguintes o paciente passaria a usar placebo. O estudo foi interrompido no quarto mês de uso de placebo, pois a melhora clínica substancial que havia ocorrido nos 8 meses de alopurinol foi regredindo ao longo dos meses em placebo e o pacientes passou a apresentar recorrência de sintomas, voltando a melhorar com a reintrodução da medicação.

Assim, para avaliar a eficácia do alopurinol em pacientes com esquizofrenia realizamos um ensaio clínico duplo-cego controlado com placebo e cruzado (Brunstein et al, 2005). O estudo foi realizado com uma população de pacientes refratários, em uso de medicação antipsicótica, exceto clozapina. Por tratar-se de uma subpopulação dos pacientes doentes, portanto um número menor de casos, e por serem pacientes geralmente mantidos em polifarmácia optou-se por um estudo cruzado. Apesar de questões metodológicas deste desenho de estudo como o efeito da ordem do tratamento e o efeito *carry-over*¹, é uma opção interessante para revelar efeito em estudos com número menor de sujeitos ou para grupos heterogêneos de pacientes já que o paciente é controle de si mesmo. No caso deste estudo, o contexto ambulatorial e a heterogeneidade dos pacientes pelo uso concomitante de outros psicofármacos, torna a amostra mais parecida com a população da prática clínica usual.

A melhora clinicamente significativa de em torno de um terço dos pacientes da amostra durante o período de uso de alopurinol, especialmente de sintomas positivos e de psicopatologia geral, aliado à sua ótima tolerabilidade confirma a

¹ Persistência do efeito do tratamento anterior no paciente após a troca para o tratamento seguinte.

impressão inicial de que o alopurinol seja uma medicação útil no tratamento da esquizofrenia resistente. Esse resultado adquire relevância ainda maior, pois um resultado muito semelhante foi obtido recentemente em um ensaio clínico randomizado, duplo cego em paralelo realizado por um grupo independente de pesquisadores (Akhondzadeh et al, 2005). Os pacientes, no estudo de Akhondzadeh, eram esquizofrênicos crônicos hospitalizados em fase aguda que fizeram uso, por 8 semanas, de haloperidol 15mg associado a alopurinol 300mg ao dia ou a placebo. Nesta amostra os pacientes em uso de alopurinol apresentaram resposta significativamente maior do que os que utilizaram placebo, especialmente em sintomas positivos e sintomatologia geral. Houve uma melhora no escore da PANSS em torno de 40% superior ao grupo placebo. Assim como em nosso estudo, a medicação foi bem tolerada, além de ter diminuído a necessidade de medicação anticolinérgica, o que não ocorreu em nossa amostra.

Em função dos resultados positivos obtidos por esses dois ensaios clínicos independentes, aliados às escassas opções terapêuticas de que dispomos para tratar esses pacientes, sugerimos que o alopurinol deva ser incluído nas diretrizes e algoritmos para tratamento de esquizofrenia refratária. Seu uso toma relevância ainda maior em países como o nosso, já que o custo de tratamento mensal para dose de 300mg está em torno de 20 reais, enquanto outras alternativas terapêuticas disponíveis têm alto custo, limitando o acesso nas populações mais pobres ou elevando o custo em saúde pública.

Uma questão relevante é o fato de que o alopurinol não parece ser uma medicação específica para o tratamento de esquizofrenia, já que há evidências de estudos abertos de resposta em pacientes com transtorno do humor bipolar

(Machado-Vieira et al, 2001), agressividade (Lara et al, 2000) e demência (Lara et al, 2003). Isso pode indicar que disfunções adenosinérgicas estejam envolvidas também em outras patologias neuropsiquiátricas ou de que esse sistema tem uma ação mais ubíqua. No entanto, boa parte das medicações psicotrópicas tem mais de uma indicação ou efeito terapêutico. Outra possibilidade é de que o alopurinol possa atuar por outros mecanismos como, por exemplo, por seus efeitos antioxidantes. A enzima xantina oxidase, que é alvo da ação do alopurinol, cataliza a formação de formas reativas de oxigênio. Como a resposta ao alopurinol foi maior nos pacientes mais jovens e com menor tempo de doença é possível que esteja atuando como neuroprotetor por diminuição na formação de radicais livres. Neste caso, também por esse mecanismo é possível que o alopurinol seja uma droga que influenciaria positivamente o curso da doença se usado desde o surgimento de seus primeiros sinais clínicos.

Portanto, como perspectivas, sugerimos caracterizar melhor o efeito terapêutico do alopurinol, os mecanismos através dos quais ele produz seus efeitos positivos, seus efeitos a longo prazo e sua potencial eficácia associado à clozapina. Novos estudos também devem ser feitos a fim de caracterizar melhor o envolvimento do sistema purinérgico na esquizofrenia e outras patologias neuropsiquiátricas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS PARTES I E III

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. PNAS 2000; 97: 8104-8109.
2. Abi-Dargham, A. and Laruelle, M. Mecanismos of action of second generation antipsicotic drugs in schizophrenia: insights from brain imaging studies. European Psychiatry 2005; 20: 15-27.
3. Akhondzadeh S., Safarcherati A., Amini H. Beneficial antipsychotic effects of allopurinol as add-on therapy for schizophrenia: a double blind, randomized and placebo controlled trial. Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry 2005; 29: 253-259.
4. Almeida-Filho N., Mari J de J., Coutinho E., Franca JF., Fernandes J., Andreoli SB., Busnello ED. Brazilian multicentric study of psychiatric morbidity: methodological features and prevalence estimates. Br J Psychiatry 1997;171: 524-9.
5. Anand A., Charney DS., Oren DA., Berman RM., Hu XS., Cappiello A., Krystal JH. Attenuation of the Neuropsychiatric Effects of Ketymine with Lamotrigine. Arch Gen Psychiatry 2000; 57: 270-276.
6. Andin P, Widermark N, Axelsson R, Nyberg G, Olofsson U, Martensson E et al. Characterization of MK-801-induced behavior as a putative rat model of psychosis. J Pharmacol Exp Ther 1999; 290: 1393-1408.

7. Benes FM., McSparren J., San-Giovanni JP. & Vincent SL. Deficits in small interneurons in cingulate cortex of schizophrenic and schizoaffective patients. *Arch Gen Psychiatry* 1991; 48: 996-1001.
8. Bressan RA, Erlandsson K, Stone JM, Mulligan RS, Krystal JH, Ell PJ, PilowskyLS. Impact of schizophrenia and chronic antipsychotic treatment on [123I] CNS-1261 binding to N-methyl-D-aspartate receptors in vivo. *Biol Psychiatry*. 2005 Jul 1; 58:41-6.
9. Browne RG., Welch WM. Stereoselective antagonism of phencyclidine's discriminative properties by adenosine receptor agonists. *Science* 1982; 217: 1157-1159.
10. Brundage JM., Dunwiddie TV. Role of adenosine as a modulator of synaptic activity in the central nervous system. *Adv Pharmacol* 1997; 39:353-391.
11. Brunstein MG, Ghisolfi ES, Ramos FL, Lara DR. A clinical trial of adjuvant allopurinol therapy for moderately refractory schizophrenia. *J Clin Psychiatry* 2005; 66: 213-9.
12. Buchanan RW., Carpenter WT. Concept of Schizophrenia. In: Sadock BJ, Sadock VA, editors. *Kaplan & Sadock's comprehensive textbook of psychiatry*. 8th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005. p. 1329-45.
13. Buckley P., Miller A., Olsen J., Garver D., Miller DD., Csernansky J. When symptoms persist: clozapine augmentation strategies. *Schizophr Bull* 2001; 27: 615-28.

14. Bullmore ET., Frangou S., Murray RM The dysplastic net hypothesis: an integration of developmental and dysconnectivity theories of schizophrenia. *Schizophr Res* 1997; 28: 143-156.
15. Cerqueira L. *Problemas Brasileiros de Saúde Mental*. 1984. Atheneu, RJ.
16. Citrome L., Bilder RM., Volavka J. Managing treatment-resistant schizophrenia: evidence from randomized clinical trials. *J Psychiatr Pract*. 2002; 8:205-15.
17. Citrome L. Schizophrenia and valproate. *Psychopharmacol Bull*. 2003; 37 S2: 74-88.
18. Coleman, M. A crossover study of allopurinol administration to a schizophrenic child. *Journal of Autism and Childhood Schizophrenia*, 1974; 4: 231-240.
19. Conley RR., Kelly DL., Nelson MW., Richardson CM., Feldman S., Benham R., Steiner P., Yu Y., Khan I., McMullen R., Gale E., Mackowick M., Love RC. Risperidone, Quetiapine, and Fluphenazine in the Treatment of Patients With Therapy-Refractory Schizophrenia. *Clin Neuropharmacol*. 2005; 28:163-168.
20. Cunha RA. Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. *Neurochem.Int* . 2001; 38: 107-125.

21. 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.
22. Domino EF., Mirzoyan D., Tsukada H. N-methyl-D-aspartate antagonists as drug model of schizophrenia: a surprising link to tobacco smoking. *Progress Neuropsychopharmacol Biological Psychiatry* 2004; 28: 801-11.
23. Dunwiddie TV and Masino AS. The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annu Rev Neurosci.* 2001; 24:31-55.
24. During MJ., Spencer DD. Adenosine: a potential mediator of seizure arrest and postictal refractoriness. *Ann Neurol.* 1992; 32: 618-24.
25. Egan MF., Hyde TM. Schizophrenia: neurobiology. In: Sadock BJ, Sadock VA, editors. *Kaplan & Sadock's comprehensive textbook of psychiatry.* 7th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2000. p. 1129-47.
26. 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.
27. Ferre S. Adenosine-dopamine interactions in the ventral striatum: implications for the treatment of schizophrenia. *Psychopharmacology* 1997; 133: 107-120.
28. Fredholm BB., Battig K, Holmen J., Nehlig A., Zvartau EE. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacol Rev.* 1999; 51: 83-133.

29. Fredholm BB., Chen JF., Cunha RA., Svenningsson P., Vaugeois JM. Adenosine and brain function. *Int Rev Neurobiol.* 2005; 63:191-270.
30. Fredman R. Schizophrenia. *New England Journal of Medicine* 2003; 349: 1738-49.
31. Goff DC., Coyle JT. The emerging role of glutamate in the pathophysiology and treatment of schizophrenia. *Am J Psychiatry* 2001; 158:1367-77.
32. Hafner H., an der Heiden W., Behrens S., Gattaz WF., Hambrecht M., Loffler W., Maurer K., Munk-Jorgensen P., Nowotny B., Riecher-Rossler A., Stein A. Causes and consequences of the Gender Difference in age at onset of schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin* 1998; 24: 99-113.
33. Hellewell JS. Treatment-resistant schizophrenia: reviewing the options and identifying the way forward. *J Clin Psychiatry.* 1999; 60:S14-9.
34. 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.
35. Heresco-Levy U. Glutamatergic neurotransmission modulation and the mechanism of antipsychotic atypicality. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 2003; 27:1113-23.
36. Hesslinger B., Normann C., Langosch JM., Klose P., Berger M., Walden J. Effects of carbamazepine and valproate on haloperidol plasma levels and on psychopathologic outcome in schizophrenic patients. *J Clin Psychopharmacol* 1999; 19: 310-315.

37. Josiassen RC., Joseph A., Kohegyi E., Stokes S., Dadvand M., Paing WW., Shaughnessy RA. Clozapine augmented with risperidone in the treatment of schizophrenia: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Am J Psychiatry*. 2005; 162:130-6.
38. Jungerman T., Rabinowitz D., Klein E. Deprenyl augmentation for treating negative symptoms of schizophrenia: a double-blind, controlled study. *J Clin Psychopharmacol*. 1999;19: 522-5.
39. Kapur S. How antipsychotics become anti-"psychotic" - from dopamine to salience to psychosis. *Trends Pharmacol Sci*. 2004;25: 402-6.
40. 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.
41. 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.
42. 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.
43. Lara DR., Belmonte-de-Abreu P., Souza DO. Allopurinol for the treatment of refractory aggression and self-inflicted behavior. *J Psychopharmacol* 2000; 14: 81-83.

44. 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.
45. Lara DR., Cruz MR., Xavier F., Souza DO., Moriguchi EH. Allopurinol for the treatment of aggressive behaviour in patients with dementia. *Int. Clin. Psychopharmacol* 2003; 18: 53-55.
46. 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. *PNAS* 1996; 93: 9235-9240.
47. Lee MS., Kim YK., Lee SK., Suh KY. A double-blind study of adjunctive sertraline in haloperidol-stabilized patients with chronic schizophrenia. *J Clin Psychopharmacol* 1998; 18: 399-403.
48. Lerner V., Bergman J., Borokhov A., Loewenthal U., Miodownik C. Augmentation with amisulpride for schizophrenic patients nonresponsive to antipsychotic monotherapy. *Clin Neuropharmacol.* 2005; 28: 66-71.
49. Lewis DA, Levitt P Schizophrenia as a disorder of neurodevelopment. *Annu.Rev.Neurosci* 2002; 25: 409-432
50. Lieberman J., Chakos M., Wu H., Alvir J., Hoffman E., Robinson D., Bilder R. Longitudinal Study of Brain Morphology in First Episode Schizophrenia. *Biol Psy* 2001; 48:487-99

51. Linden JM. Purinergic Systems in Siegel GJ.; Agranoff BW.; Fisher SK.; Albers WR.; Uhler MD. editors; Basic Neurochemistry Molecular, Cellular and Medical Aspects. Sixth Edition, Lippincott Williams & Wilkins, 1999. cap 17.
52. Machado-Vieira R., Lara DR., Souza DO., Kapczinski F. Therapeutic efficacy of allopurinol for mania associated to hyperuricemia. *J Clin Psychopharmacol* 2001; 21:621-622.
53. Machado-Vieira R., Lara DR., Souza DO., Kapczinski F. Therapeutic efficacy of allopurinol in mania associated with hyperuricemia. *J Clin Psychopharmacol* 2001; 21:621-2.
54. 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.
55. Moghaddam B, Adams BW. Reversal of phencyclidine effects by a group II metabotropic glutamate receptor agonist in rats. *Science* 1998; 281:1349-52.
56. Moghaddam B. Bringing order to the glutamate chaos in schizophrenia. *Neuron* 2003, 40: 881-4.
57. 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.

58. 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.
59. Neppe VW. Carbamazepine in nonresponsive psychosis. *J. Clin. Psychiatry*, 1988; 49: s22-s33.
60. O'Regan MH., Phillis JW., Walter GA. The effect of the xanthine oxidase inhibitors, alopurinol and oxypurinol on the pattern of purine release from hypoxic rat cerebral cortex. *Neurochemistry International* 1989; 14: 91-9.
61. Olney JW. & Farber NB.. Glutamate Receptor Dysfunction and Schizophrenia. *Arch Gen Psy* 1995; 52: 998-1007.
62. 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; 333:143-146.
63. Porkka-Heiskanen T, Alanko L, Kalinchuk A, Stenberg D. Adenosine and sleep. *Sleep Med Rev.* 2002; 6: 321-32.
64. Remy P. and Samson Y. The role of dopamine in cognition: evidence from functional imaging studies. *Current Opinion in Neurology* 2003; 16: S37-41.
65. Roberts II LJ., Morrow JD. Analgesic-antipyretic and antiinflammatory agents and drugs employed in the treatment of gout. In: Hardman JG, Limbird LE, Gilman AG, editors. *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 10th Edition. 2001; USA, McGraw Hill, pp.687-731.

66. Sawa A., Snyder SH. Schizophrenia: Diverse approaches to a complex disease. *Science* 2002; 296: 692-5.
67. Schulz SC, Thompson PA, Jacobs M, Ninan PT, Robinson D, Weiden PJ, Yadalam K., Glick ID., Odbert CL. Lithium augmentation fails to reduce symptoms in poorly responsive schizophrenic outpatients. *J Clin Psychiatry*. 1999; 60: 366-72.
68. Sedvall G., Farde L. Chemical brain anatomy in schizophrenia. *Lancet* 1995; 346:743-49.
69. 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.
70. Soares JC., Innis RB. Neurochemical brain imaging investigations of schizophrenia. *Biol Psychiatry* 1999; 46:600-15.
71. Stern RG., Schmeidler J., Davidson M. Limitations of controlled augmentation trials in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 1997; 42:138-43.
72. Strous RD. Dehydroepiandrosterone (DHEA) augmentation in the management of schizophrenia symptomatology. *Essent Psychopharmacol* 2005; 6:141-7.
73. Tada H., Morooka K., Arimoto K., Matsuo T. Clinical effects of allopurinol on intractable epilepsy. *Epilepsia*. 1991; 32:279-83.
74. Tamminga CA. Schizophrenia and glutamatergic transmission. *Critical Reviews in Neurobiology* 1998; 12: 21-36.

75. Tiihonen J, Hallikainen T, Ryyanen OP, Repo-Tiihonen E, et al. Lamotrigine in treatment-resistant schizophrenia: a randomized placebo-controlled crossover trial. *Biol Psychiatry*. 2003 Dec 1; 54: 1241-8.
76. Tiihonen J., Halonen P., Wahlbeck K., Repo-Tiihonen E., Hyvarinen S, Eronen M., et al. Topiramate Add-On in Treatment-Resistant Schizophrenia: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Crossover Trial. *J Clin Psychiatry* 2005; 66:1012-1015.
77. Tsai G., Lane HY., Yang P., Chong MY., Lange N. Glycine transporter 1 inhibitor, N-Methylglycine (sarcosine), added to antipsychotics for the treatment of schizophrenia. *Biol Psychiatry* 2004; 55:452-6.
78. Turner CP., Yan H., Schwartz M., Othman T., Rivkees. SA. A1 adenosine receptor activation induces ventriculomegaly and white matter loss. *Neuroreport* 2002; 13: 1199-1204.
79. Ushijima I., Katsuragi T, Furukawa T. Involvement of adenosine receptor activities in aggressive responses produced by clonidine in mice. *Psychopharmacology* 1984; 83: 335-339.
80. Weinberger DR. From Neuropathology to neurodevelopment. *Lancet* 1995; 346:552-57.
81. Williams M. Purinoceptors in Central Nervous System Function. In: Bloom FE.; Kupfer DJ., editors. *Psychopharmacology: The Forth Generation of Progress*. Raven Press.Ltd; 1995.p.643-655.

82. Winterer G., Weinberger DR. Genes, dopamine and cortical signal-to-noise ratio in schizophrenia *TRENDS in Neuroscience* 2004; 27: 683-90.
83. Wolkowitz OM., Turetsky N., Reus VI., Hargreaves WA. Benzodiazepine augmentation of neuroleptics in treatment-resistant schizophrenia. *Psychopharmacol Bull.* 1992; 28: 291-5.
84. Zagnoni PG., Bianchi A., Zolo P., Canger R., Cornaggia C., D'Alessandro P., DeMarco P., Pisani F., Gianelli M., Verze L, et al. Allopurinol as add-on therapy in refractory epilepsy: a double-blind placebo-controlled randomized study. *Epilepsia.*1994;35:107-12.
85. Zimmermann H. Extracellular Purine Metabolism. *Drug Development Research* 1996; 39: 337-352.
86. 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.

ANEXO I

TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO PARA PACIENTES

Nome:

Data de nascimento: / /

Número:

Médico:

Estudo de potencialização de antipsicóticos com Alopurinol

Antes de participar deste estudo, gostaríamos que você tomasse conhecimento do que ele envolve. Necessitando de outros esclarecimentos sobre o estudo e sobre os seus direitos, você deverá contatar a Dra Miriam Garcia Brunstein pelos telefones 3221-6966 ou 9955-1707, ou com o Dr. Diogo Rizzato Lara pelos telefones 3331-8130 ou 9987-7206.

Qual o objetivo da pesquisa?

Com este estudo estamos testando um novo remédio para o tratamento da esquizofrenia. O alopurinol será usado em combinação com o antipsicótico em uso pelo paciente, buscando melhorar os sintomas em pessoas que respondem pouco ao tratamento convencional.

Quais são os riscos em participar?

O alopurinol é usado há muito tempo em pacientes com aumento do ácido úrico e com gota. Os efeitos colaterais são raros (menos de 5% dos casos) e incluem: dor de barriga, diarreia e alergia de pele..

Como será o estudo ?

O estudo acontecerá por 12 semanas, com consultas a cada 3 semanas após o paciente ser selecionado. Além do remédio que o paciente já usa, ele tomará uma cápsula de manhã e outra à noite de 300 mg de alopurinol por 6 semanas e nas outras 6 semanas ele tomará cápsulas de placebo. O placebo é uma cápsula sem efeito químico (por exemplo, com farinha) que é usado para comparar com a medicação em estudo e verificar se ela realmente traz benefícios para o paciente. O paciente e o médico não saberão a ordem dos tratamentos, para evitar que as avaliações sejam tendenciosas. Apenas um outro médico que não estará envolvido diretamente na avaliação do paciente terá essa informação.

Em cada consulta (às terças pela manhã) o paciente e o responsável serão entrevistados pela Dra. Miriam ou o Dr. Diogo, e na primeira, terceira e quinta consulta será feito um exame de sangue e um exame de potencial evocado com o paciente

A coleta de sangue (dois tubos pequenos) é um procedimento corriqueiro e de baixíssimo risco e que não compromete em nada a saúde do paciente. O exame será feito com material esterilizado e descartável por profissionais da área de saúde com competência técnica. O exame de potencial evocado é parecido com o exame de eletroencefalografia, onde são usados 5 fios para medir a atividade elétrica do cérebro.

Não é invasivo, não causa dor e dura em torno de 15 minutos, sendo realizado às terças no período da tarde.

Itens importantes

Sua participação neste estudo é voluntária. O paciente e o responsável têm a liberdade de desistir do estudo a qualquer momento, sem fornecer um motivo, assim como pedir maiores informações sobre o estudo e o procedimento a ser feito.

O que eu ganho com este estudo?

Sua colaboração neste estudo visa acrescentar para o conhecimento científico sobre o tratamento da esquizofrenia. Além disso, a curto e médio prazos o paciente pode se beneficiar com tratamento em estudo.

Quais são os meus direitos?

Os pesquisadores do serviço de psiquiatria e os representantes das autoridades competentes da Biosegurança podem precisar examinar os seus registros a fim de verificar as informações para o objetivo deste estudo. No entanto, os seus registros médicos serão sempre tratados confidencialmente.

Os resultados deste estudo poderão ser publicados em um jornal científico ou submetido à autoridade de medicamento competente, mas você não será identificado por nome.

1. Concordo total e voluntariamente em fazer parte deste estudo; tenho mais de 18 anos.
2. Recebi uma explicação completa do objetivo do estudo, dos procedimentos envolvidos e o que se espera de mim. O médico me explicou os possíveis problemas que podem surgir em consequência da minha participação neste estudo.
3. Informei o médico sobre medicamentos que estou tomando.
4. Concordo em cooperar inteiramente com o médico supervisor.
5. Estou ciente de que tenho total liberdade de desistir do estudo a qualquer momento e que esta desistência não irá, de forma alguma, afetar meu tratamento ou administração médica futura.
6. Estou ciente de que a informação nos meus registros médicos é essencial para a avaliação dos resultados do estudo. Concordo em liberar esta informação sob o entendimento de que ela será tratada confidencialmente.
7. Estou ciente de que não serei referido por nome em qualquer relatório relacionado a este estudo. Da minha parte, não devo restringir, de forma alguma, os resultados que possam surgir neste estudo.

Paciente:	Responsável:
Assinatura: _____	Assinatura: _____
Nome: _____	Nome: _____
Data: _____	Data: _____

Médico:	Testemunha:
Assinatura: _____	Assinatura: _____
Nome: _____	Nome: _____
Data: _____	Data: _____

ANEXO II

Normas para publicação na revista

**Progress in neuro-psychopharmacology & biological
psychiatry**

Guide for Authors

Submission of Articles

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all Authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the Publisher.

Title page, abstract (including key words and abbreviation list), tables, figure legends, abbreviations and reference list should each be provided on separate sheets of paper. The name, full postal address, email, fax and telephone numbers of the corresponding author should be indicated

Language

Articles should be submitted in English. If English is not their native language, authors are recommended to consult a colleague whose English could be regarded as impeccable. For Authors in Japan please note that, upon request, Elsevier Japan will provide authors with a list of people who can check and improve the English of their paper (before submission). Please contact our Tokyo office: Elsevier, 4F Higashi-Azabu, 1 Chome Bldg. 1-9-15 Higashi-Azabu, Minato-ku, Tokyo 106-0044, Japan; phone: (03)-5561-5032; fax: (03)-5561-5045; e-mail: jp.info@elsevier.com

Number of copies

Four double spaced copies on 8½ x 11 in. paper should be sent to the address below two sets of original glossy prints (essential for photographs) should be provided. Photocopies or good reproductions of illustrations are acceptable only on the spare copies. Included also should be a set of the electronic files of the manuscript on floppy-disk, Zip-disk or CD-ROM. For preparation of electronic files, see the instructions herein below.

Electronic manuscripts.

The preferred storage medium is a 3.5 inch disk in MS-DOS format, although other systems are welcome, e.g., Macintosh (in this case, save your file in the usual manner, do not use the option save in MS-DOS format). If you use NEC, please submit your article on a double-density 3.5 disk (not on a high-density 3.5 disk). Your disk and **exactly matching**

printed version (as a printout) should be submitted together to the Editor.

It is important that the file on disk and the printout are identical.

Please specify the type of computer and word processing package used (do not convert your text file to plain ASCII). Ensure that the letter 'l' and digit '1' (also letter 'O' and digit '0') have been used properly, and format your article (tabs, indents, etc.) consistently. Characters not available on your word processor (Greek letters, mathematical symbols, etc.) should not be left open, but indicated by a unique code (e.g. galpha, @, #, etc., for the Greek letter α). Such codes should be used consistently throughout the entire text. Please make a list of such codes and provide a key. Do not allow your word processor to introduce word splits and do not use a 'justified' layout. Please adhere strictly to the general instructions on style/arrangement and, in particular, the reference style of the journal. Tables will be handled conventionally. Illustrations should be submitted as original drawings or glossy prints. Further information may be obtained from the Publisher.

Organization of manuscripts

Each type of article should contain the following parts:

1. Original articles (full length and short papers): 1) title page; 2) abstract; 3) (3-6) keywords; 4) abbreviations; 5) introduction; 6) methods; 7) results; 8) discussion; 9) conclusion; 10) acknowledgments; 11) references; 12) tables; 13) figures; 14) figure legends.

2. Review articles (mini-reviews or comprehensive reviews); 1) title page; 2) abstract; 3) (3-6) keywords; 4) abbreviations; 5) introduction.

After the introduction, each review article should have its own framework. Contributors should prepare a well-structured text using appropriate headings and subheadings. It is also highly recommended that review articles be well illustrated so that interested but non-expert readers can easily and rapidly understand the text. For further information, invited author or authors who want to submit a review article should contact the Editorial Office at the address given below.

Specific recommendations for original articles

1. Title page. This should contain:

1.1. Complete title of the article without abbreviations.

1.2. Names of all authors, with an asterisk beside the name of the corresponding author. Where the family name may be ambiguous (e.g. a double name), please indicate this clearly.

1.3. Full mailing addresses of each author, including the name of the institution and the department. Present the Authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. If an Author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a "Present address" (or Permanent address") may be indicated as a footnote to that Author's name.

1.4. Links (lowercase roman letters) connecting authors with their affiliations (all of the authors' names should be on one line and all of their affiliations on another; if authors share an affiliation, they should share the

link).

2. Abstract page. This should contain:

2.1. Abstract representing in concise form the purpose, the general methods, the findings and the conclusions of the authors.

2.2. Keywords in alphabetical order, given as an aid to indexing.

2.3. Abbreviations. Whenever an abbreviation other than those listed under General recommendations is used in an article, it is to be defined in text at first mention. An alphabetical list of abbreviations, followed by their full terms, should be placed under the keywords.

3. Body of the text

3.1. Introduction. This section should contain a clear statement of the general and specific objectives as well as the hypotheses which the work is designed to test. It should also give a brief account of the reported literature. The last sentence should clearly state the purpose of the article.

3.2. Methods. This section should contain explicit, concise descriptions of all procedures, materials and methods used in the investigation to enable the reader to judge their accuracy, reproducibility, etc. To increase clarity, headings should be used throughout. For example, the following subheadings, which should be numbered, could be used:

3.2.1. Experimental articles (full length or short papers): Animals, Drugs, Apparatus, Experimental procedure, and Statistical analysis.

3.2.2. Clinical articles (full length or short papers): Patient population, Drug administration, Study design, Assessment instruments, and Data analysis. Depending on the type of article they are preparing, authors could introduce any other subheadings they find useful.

3.3. Results. This section usually contains the experimental data, but no extended discussion of their significance. The results should be illustrated (figures and tables); data are usually easier for readers to grasp if they are represented in graphic or tabular form, rather than discursively. Graphic presentation of data is preferred. Data should not be needlessly repeated in text. Sufficient data may allow interested but non-expert readers to judge the variability and reliability of the results. The section should be well structured using appropriate subheadings.

3.4. Discussion. This should be pertinent to the results. Speculative discussion is not discouraged provided it is based on the data presented. The discussion should be as concise as possible and well structured, using appropriate subheadings.

3.5. Conclusions. A short paragraph of conclusions (5 to 10 lines) should be included.

4. Acknowledgments. These may be included at the end of the text before the References; they should have a separate heading.

5. References

5.1. *Text*. All citations in the text should refer to:

1. *Single Author*: The Author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication.
2. *Two Authors*: Both Authors' names and the year of publication.
3. *Three or more Authors*: First Author's name followed by "et al." and the year of publication. Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically. Examples: (Post et al., 2000a, 2000b, 1999; Post and Jones, 1995; Kramer et al (2000))
- 5.2. *List*. References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same Author(s) in the same year must be identified by the letters "a", "b", "c", etc., placed after the year of publication. Below are examples:
 - 5.2.1. Journal article: Nunn, JF. Clinical aspects of the interaction between nitrous oxide and vitamin B12. *Br J Anaesth* 1987; 59: 3-13
 - 5.2.2. Reference to a book: Strunk Jr W, White EB. *The elements of style*. 3rd ed. New York: Macmillan; 1979.
 - 5.2.3. Reference to a chapter in an edited book: Gross SS, Aisaka K, Jaffe EA. Nitric oxide synthesis. In: Levi R, Griffith OW, editors. *Biochemistry basics*. New York: Biopub Inc; 1990. p. 96-103Note shortened form for last page number. e.g., 51-9, and that for more than 6 Authors the first 6 should be listed followed by "et al".
For further details you are referred to "Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals"
http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html
The titles of journals should be abbreviated according to the style used in Index Medicus. Consult the list of Journals Indexed for MEDLINE, published by the National Library of Medicine,
http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/terms_cond.html
Citations of personal communications or of unpublished observations should be given in parentheses at the appropriate place in the text, not in the list of references. An article may not be cited "in press" unless it has been accepted for publication. In such cases, the name of the journal should be given.
6. *Tables*. All tables must be cited in the text, have brief, descriptive titles and be consecutively numbered with Arabic numerals. Information other than that defining the data should be presented as footnotes. Use lowercase roman letters for footnotes. Only horizontal rules should be included, and kept to a minimum.
7. *Illustrations*. Each illustration should be clearly marked on the reverse side with the name of the corresponding author, the number of the illustration and its orientation (top); use a soft pencil or felt-ripped pen, and do not press hard against the surface.
 - 7.1. *Photographs*. Photographs should be glossy prints with high contrast. Magnification should be indicated by a line representing the actual scale of reproduction (0.1 μ m, 1 μ m). Avoid the use of magnification factors whenever possible.

7.2. Line figures. Figures will not be redrawn by the Publisher. They should be black ink on white paper, or black and white prints. Do not place the title of the figure within the figure itself. The size of the lettering should be consistent, taking into consideration the possibility of reduction.

7.3. Colour. Submit colour illustrations as original photographs, high-quality computer prints or transparencies, close to the size expected in publication, or as 35 mm slides. Polaroid colour prints are not suitable. If, together with your accepted article, you submit usable colour figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in colour on the web (e.g. ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the printed version. The extra costs of colour reproduction in print will be charged to the author(s). Cost of colour is Euros 273.00 (approx. USD300) for the first page and Euros 182.00 (approx. USD200) for consecutive pages in the same article. You will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Colour figures should be clearly marked as being intended for colour reproduction both on the web (free of charge) and in print. Otherwise it should be indicated that they are to be reproduced in colour on the web (free of charge) and in black and white in print. Please note: Because of technical complications which can arise by converting colour figures to 'grey scale' for the printed version (should you not opt for colour in print) please submit in addition usable black and white prints corresponding to all the colour illustrations.

For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://authors.elsevier.com/artwork>.

8. Legends for figures. These should be typed on a separate page, double spaced as part of the text. Legends, should be numbered consecutively in Arabic numerals. Legends should explain the figures in sufficient detail so that repeated referral to the text is unnecessary. Abbreviations in the legends should conform to those in the text.

9. Footnotes. These are best avoided or they should be kept to a minimum. When used, they should be typed at the bottom of the appropriate page and separated from the text by a short line. Footnotes should be used for authors' degrees and positions, proprietary names and trademarked drugs and other materials not appropriately referred to in the text or in the reference list.

General recommendations

Abbreviations

The following abbreviations or their properly prefixed multiples and submultiples may be used without definition in the text, tables or figures (Notice to contributors, 1981, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*):

<i>Units of mass</i>		<i>Units of length or volume</i>	
gram	g	meter	m
mole	mol	micron	μ
equivalent	Eq	Angstrom	Å
microatom	μat	liter (spell out in text)	l
<i>Units of concentration</i>		<i>Units of time</i>	
molar (moles/liter)	M	hour	hr
normal (EQ/liter)	N	minute	min
percent	%	second	sec
<i>Units of electricity</i>		<i>Miscellaneous</i>	
volt	V	degrees of temperature	°C
ampere	A	gravity	g
cycles/sec	Hz	median doses	LD ₅₀ , ED ₅₀ , etc.
<i>Units of radioactivity</i>		Optically isometric	
curie	Ci	forms	d-, l-, d
counts per min	cpm	routes of drug	i.v., i.p., s.c.
disintegration per min	dpm	administration	i.m.
roentgen	r	standard deviation	S.D.
		standard error	S.E.

Drug nomenclature

Generic names should be used in text, tables and figures. Trade names and the name and city of their manufacturer may be mentioned in parentheses in the first text reference to the drug, but should not appear in titles, figures or tables. Chemical names could also be used. Code numbers could be given in brackets. When a trade name is used, it should be capitalized; general or chemical names are not capitalized. The chemical nature of new drugs must be given when known. The form of drug used in calculations of doses (e.g., base or salt) should be indicated.

Ethical Standards

- The authors declare that all experiments on human subjects were conducted in accordance with the Declaration of Helsinki <http://www.wma.net> and that all procedures were carried out with the adequate understanding and written consent of the subjects.
- The authors also certify that formal approval to conduct the experiments described has been obtained from the human subjects review board of their institution and could be provided upon request.
- If the studies deal with animal experiments, the authors certify that they were carried out in accordance with the National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publications No. 80-23) revised 1996 or the UK Animals (Scientific Procedures) Act 1986 and associated guidelines, or the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC).
- The authors also certify that formal approval to conduct the experiments described has been obtained from the animal subjects review board of their institution and could be provided upon request.
- The authors further attest that all efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering.

- If the ethical standard governing the reported research is different from those guidelines indicated above, the authors must provide information in the submission cover letter about which guidelines and oversight procedures were followed.
- The Editor reserves the right to return manuscripts in which there is any question as to the appropriate and ethical use of human or animal subjects.

Reprints

The Publisher will supply to the main author 25 reprints free of charge. Further reprints can be supplied at a reasonable price. Authors should complete the reprint request form supplied by the Publisher and return it with the signed copyright transfer form, also supplied by the Publisher.

Mailing

Place disks in a disk mailer; place manuscripts between thick cardboard when mailing.

Proofs

If the e-mail address of the corresponding author is provided, the author will receive his proofs as a PDF attachment to an e-mail. To view these proofs, the author must have Acrobat Reader, which is available free of charge from Adobe (download from <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep.html>). If no e-mail address is provided, or if the corresponding author prefers page proofs, those will be sent instead.

Elsevier will do everything possible to get your article corrected and published as quickly and accurately as possible, both online ([ScienceDirect](#)) and in print. **Therefore, it is important to ensure that all your corrections are sent back to us in one communication.** Subsequent corrections will not be possible, so please ensure your first sending is complete.

Further information

For any information regarding the preparation and forwarding of manuscripts, authors may contact

Editorial Office:

PROGRESS IN NEURO-PSYCHOPHARMACOLOGY & BIOLOGICAL PSYCHIATRY

Unité de recherche en neuroscience

RC9800, Centre de Recherche du CHUL

2705 boul, Laurier

Sainte-Foy, (Québec)

CANADA G1V 4G2

Tel: (418) 656-4141 (ext: 8531); Fax: (418) 654-2753

Email: monique.baron@crchul.ulaval.ca