

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE NEUROCIÊNCIAS E CIÊNCIAS DO
COMPORTAMENTO

GIOVANA JORGE GARCIA

**Efeito do nitroprussiato de sódio em voluntários saudáveis e
pacientes portadores de esquizofrenia: um estudo de ressonância
magnética funcional**

Ribeirão Preto
2016

GIOVANA JORGE GARCIA

**Efeito do nitroprussiato de sódio em voluntários saudáveis e
pacientes portadores de esquizofrenia: um estudo de ressonância
magnética funcional**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Saúde Mental da Faculdade de Medicina de Ribeirão
Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Medicina.

Área de concentração: Saúde Mental
Orientador: Prof. Dr. Jaime Eduardo Cecilio Hallak

Ribeirão Preto
2016

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Garcia, Giovana Jorge.

Efeito do nitroprussiato de sódio em voluntários saudáveis e pacientes portadores de esquizofrenia: um estudo de ressonância magnética funcional/ Giovana Jorge Garcia. Ribeirão Preto, 2016.

146 f.: il.

Tese de doutorado - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, 2016.

Orientador: Jaime Eduardo Cecilio Hallak

1.Esquizofrenia. 2.Óxido nítrico. 3.Nitroprussiato de sódio. 4. *Default mode network*. 5.Ressonância magnética funcional.

Nome: Garcia, Giovana Jorge

Título: Efeito do nitroprussiato de sódio em voluntários saudáveis e pacientes portadores de esquizofrenia: um estudo de ressonância magnética funcional.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Mental da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Medicina.

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Ao meu amado marido Felipe, por caminhar
ao meu lado nas estradas retilíneas e sinuosas
que a vida nos encarrega de percorrer, me
inspirando, ensinando, amando e fortalecendo.
Este é mais um dos nossos frutos...sonhado,
desenhado e conquistado a dois.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Jaime Eduardo Cecilio Hallak, por ter acreditado em mim e me proporcionado um crescimento imensurável de conhecimento e maturidade, profissional e pessoal, e ainda ter me presenteado com sua amizade e zelo.

Ao Prof. Dr. Dráulio Barros de Araújo e Prof. Dr. Antônio Carlos dos Santos, por toda disponibilidade, atenção e contribuição imprescindível para a realização desse projeto. Esse trabalho é nosso.

Ao Prof. Dr. João Abrão, pela parceria tão receptiva ao longo de toda a coleta de dados.

Aos colegas do setor de Radiologia, em especial a Luciana, Cecílio, Mário, Carolina e Adriana, pelo auxílio fundamental ao longo de toda a coleta e organização do dados.

À minha amiga Maria Fernanda Furtado Diniz, por sua amizade e presença constante na minha vida, me acolhendo sempre carinhosamente em seu lar.

Ao meu amigo Diogo Cunha, por sua amizade, cumplicidade e importante ajuda no andamento desse processo quando eu já estava distante de Ribeirão Preto.

À minha colega Juliana Mayumi Ushirohira, que prontamente me auxiliou ao longo de todo o trabalho, mas especialmente no momento que minha presença não foi possível.

A todos os voluntários que participaram e acreditaram em meu trabalho, em especial aos pacientes e familiares que foram os verdadeiros protagonistas.

E por fim mas de importância inigualável, agradeço profundamente aos meus pais, por terem sido os primeiros a me direcionar nesta jornada de amor ao conhecimento, sempre me incentivando e me dando segurança para caminhar mais longe. Sem meus alicerces, nada disso seria possível.

"Uma mente que tenha sido estirada por novas ideias nunca poderá recobrar sua forma original".

Albert Einstein

RESUMO

GARCIA, G.J. **Efeito do nitroprussiato de sódio em voluntários saudáveis e pacientes portadores de esquizofrenia: um estudo de ressonância magnética funcional.** 2016. 146f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Apesar dos numerosos estudos enfocando a compreensão da esquizofrenia, sua etiologia permanece desconhecida. Atualmente, as medicações antipsicóticas disponíveis são baseadas principalmente na hipótese dopaminérgica, porém, apresentam eficácia parcial no tratamento dos sintomas. Diante disso, outros sistemas neurais têm sido investigados e, nesse contexto, a hipótese glutamatérgica conquistou grande importância. Essa hipótese postula a presença de uma hipoatividade do receptor glutamatérgico N-metil-D-aspartato na esquizofrenia e, conseqüentemente, de uma desregulação na neurotransmissão do óxido nítrico. Um ensaio clínico recente com a administração de nitroprussiato de sódio, um doador de óxido nítrico, mostrou resultados significativos na melhora da sintomatologia de pacientes esquizofrênicos, entretanto, nenhum estudo de neuroimagem investigou quais são os efeitos dessa droga no sistema nervoso central. No crescente campo de estudo da neuroimagem funcional as redes neurais foram descobertas, sendo a *default mode network* uma das mais estudadas na esquizofrenia. Os recentes estudos de neuroimagem funcional têm evidenciado alterações do funcionamento dessa rede neural nos pacientes portadores da doença, evidenciando assim, a importância da *default mode network* na compreensão da esquizofrenia. Nesse caminho, o presente estudo investigou os efeitos agudos da administração de nitroprussiato de sódio na conectividade funcional da rede *default mode network* através da ressonância magnética funcional mediada pelo contraste BOLD (*blood oxygen level dependent*) em pacientes portadores de esquizofrenia e em voluntários saudáveis. Os pacientes portadores de esquizofrenia foram divididos em dois grupos de acordo com a medicação antipsicótica em uso: grupo sem clozapina (n=13) e grupo com clozapina (n=13). Os voluntários saudáveis também foram divididos em grupo controle (n=14) e grupo controle com tarefa de escuta passiva (n=5). Todos os pacientes portadores de esquizofrenia e o grupo controle foram submetidos a um protocolo de infusão de nitroprussiato de sódio com aquisição simultânea de imagens funcionais. Nossos resultados mostraram um aumento da conectividade funcional da *default mode network* com a infusão da medicação nos pacientes portadores de esquizofrenia, especialmente no hemisfério direito, enquanto esse mesmo

padrão não foi encontrado nos controles saudáveis. Além disso, o aumento na conectividade se mostrou distinto entre os grupos de pacientes avaliados, sendo mais precoce e amplo no grupo de pacientes que não estava em uso do antipsicótico clozapina. Observamos também que o efeito modulatório da droga ocorreu sobre regiões da *default mode network* já estudadas e fortemente implicadas na fisiopatologia da esquizofrenia. Assim, nossa investigação neurofuncional contribuiu para a compreensão dos efeitos terapêuticos do nitroprussiato de sódio na sintomatologia de pacientes portadores de esquizofrenia. Nossos achados também reforçam a importância do nitroprussiato de sódio como uma nova ferramenta farmacológica adjuvante no tratamento da esquizofrenia.

Palavras chaves: esquizofrenia, óxido nítrico, nitroprussiato de sódio, *default mode network*, ressonância magnética funcional.

ABSTRACT

GARCIA, G.J. **Effect of sodium nitroprusside in healthy volunteers and patients with schizophrenia: a functional magnetic resonance imaging study.** 2016. 146f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Despite numerous studies focusing on the understanding of schizophrenia, its etiology remains unknown. Currently, available antipsychotic medications are mainly based on dopamine hypothesis, however, they exhibit partial efficacy in the treatment of the symptoms. Therefore, other neural systems have been investigated and, in this context, the glutamatergic hypothesis gained great importance. This hypothesis postulates the presence of a hypoactivity of the N-methyl-D-aspartate glutamate receptor in schizophrenia and, consequently, a deregulation of nitric oxide neurotransmission. A recent clinical trial with the administration of sodium nitroprusside, a nitric oxide donor, showed significant results in improving the symptoms of schizophrenic patients, however, no neuroimaging study investigated what are the effects of this drug on the central nervous system. The neural networks were discovered from the growing field of functional neuroimaging study and the default mode network is one of the most studied in schizophrenia. The recent functional neuroimaging studies have shown alterations in the functioning of this neural network in patients with the disease, highlighting the importance of the default mode network in the understanding of schizophrenia. In this way, the present study investigated the acute effects of sodium nitroprusside administration in the functional connectivity of the default mode network using blood oxygen level dependent (BOLD) functional magnetic resonance imaging in patients with schizophrenia and healthy volunteers. Schizophrenic patients are divided into two groups according to antipsychotic medication used: group treated without clozapine (n = 13) and group treated with clozapine (n = 13). Healthy volunteers were also divided into control group (n = 14) and control group with passive listening task (n = 5). All schizophrenic patients and healthy volunteers were subjected to a sodium nitroprusside infusion protocol simultaneously to acquisition of functional images. Our results showed increased default mode network functional connectivity with the drug infusion in patients with schizophrenia, mainly in the right hemisphere, while this same pattern was not found in healthy controls. In addition, the increase in connectivity was distinct between groups of patients because it was earlier and more extensive in the group of patients that was not in use of clozapine antipsychotic. We also

note that the drug modulatory effect occurred on default mode network regions already studied and strongly implicated in the schizophrenia pathogenesis. Thus, our neurofunctional research contributed to the understanding of the sodium nitroprusside therapeutic effects on the schizophrenia symptoms. Our findings also underline the importance of sodium nitroprusside as a new adjuvant pharmacological tool in the treatment of schizophrenia.

Keywords: schizophrenia, nitric oxide, sodium nitroprusside, default mode network, functional magnetic resonance imaging.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma da seleção e divisão dos voluntários incluídos.....	42
Figura 2 - Representação do procedimento de infusão da droga experimental e aquisição das imagens.....	48
Figura 3 - Localização das duas <i>seeds</i> (em MNI) utilizadas na análise da conectividade funcional: PCC (-4, -47, 45) e mPFC (0, 51, -14).....	50
Figura 4 - (a) Desenho experimental do protocolo - cinco blocos de repouso e quatro blocos de escuta passiva, alternados e com duração de dez segundos. (b) Matriz de design do GLM. A coluna 1 contém o modelo do sinal BOLD do protocolo e a coluna 2 representa uma constante.....	52
Figura 5 - Máscara do córtex auditivo construída anatomicamente a partir das áreas de Brodmann 41 (amarelo), 42 (azul) e 22 (vermelho).....	53
Figura 6 - Fluxograma representando a exclusão dos voluntários por artefato de movimento.....	56
Figura 7 - Alterações na conectividade funcional da DMN no grupo de pacientes sem CLZ no contraste NPS > pré-NPS. A conectividade aumentou no cuneus e no pré-cuneus. Valores de p não corrigidos, $p < 0,001$	60
Figura 8 - Alterações na conectividade funcional da DMN no grupo de pacientes sem CLZ no contraste pós-NPS > NPS. A conectividade aumentou no subgirar, giro temporal inferior e no giro temporal médio. Valores de p não corrigidos, $p < 0,001$	61
Figura 9 - Alterações na conectividade funcional da DMN no grupo de pacientes com CLZ no contraste pós-NPS > NPS. A conectividade aumentou no giro frontal superior. Valores de p não corrigidos, $p < 0,001$	63
Figura 10 - Alterações na conectividade funcional da DMN no grupo controle no contraste pré-NPS > pós-NPS. A conectividade aumentou no giro temporal médio. Valores de p não corrigidos, $p < 0,001$	64
Figura 11 - Alterações na conectividade funcional da DMN na condição pré-NPS no contraste controle > pacientes. A conectividade aumentou no giro temporal médio e no giro temporal superior. Valores de p não corrigidos, $p < 0,001$	66
Figura 12 - Alterações na conectividade funcional da DMN na condição pré-NPS no contraste pacientes > controle. A conectividade aumentou no giro temporal médio, no giro temporal superior, no giro angular, no giro supramarginal e no lobo parietal inferior. Valores de p não corrigidos, $p < 0,001$	67
Figura 13 - Alterações na conectividade funcional da DMN na condição NPS no contraste pacientes > controle. O <i>cluster</i> 1 tem 139 <i>voxels</i> e está sinalizado pela cruz. Nele a conectividade aumentou no giro temporal superior, no giro angular, no giro supramarginal e no lobo parietal inferior. Valores de p não corrigidos, $p < 0,001$	68

Figura 14 - Alterações na conectividade funcional da DMN na condição NPS no contraste pacientes > controle. O <i>cluster 2</i> tem 56 <i>voxels</i> e está sinalizado pela cruz. Nele a conectividade aumentou no giro angular, no giro supramarginal e no lobo parietal inferior. Valores de p não corrigidos, $p < 0,001$	68
Figura 15 - Alterações na conectividade funcional da DMN na condição pós-NPS no contraste pacientes > controle. O <i>cluster 1</i> tem 263 <i>voxels</i> e está sinalizado pela cruz. Nele a conectividade aumentou no giro temporal médio, no giro temporal superior, no giro angular, no giro supramarginal e no lobo parietal inferior. Valores de p não corrigidos, $p < 0,001$	70
Figura 16 - Alterações na conectividade funcional da DMN na condição pós-NPS no contraste pacientes > controle. O <i>cluster 2</i> tem 113 <i>voxels</i> e está sinalizado pela cruz. Nele a conectividade aumentou no giro temporal médio direito. Valores de p não corrigidos, $p < 0,001$	70
Figura 17 - Alterações na conectividade funcional da DMN na condição pós-NPS no contraste pacientes > controle. O <i>cluster 3</i> tem 78 <i>voxels</i> e está sinalizado pela cruz. Nele a conectividade aumentou no giro temporal médio esquerdo. Valores de p não corrigidos, $p < 0,001$	70
Figura 18 - Alterações na conectividade funcional da DMN na condição pós-NPS no contraste pacientes > controle. O <i>cluster 4</i> tem 31 <i>voxels</i> e está sinalizado pela cruz. Nele a conectividade aumentou no giro angular, no giro supramarginal e no lobo parietal inferior. Valores de p não corrigidos, $p < 0,001$	71
Figura 19 - Alterações na conectividade funcional da DMN na condição pré-NPS no contraste paciente com CLZ > controle. A conectividade aumentou no giro angular, no giro supramarginal e no lobo parietal inferior. Valores de p não corrigidos, $p < 0,001$	73
Figura 20 - Alterações na conectividade funcional da DMN na condição NPS no contraste paciente sem CLZ > controle. O <i>cluster 1</i> tem 131 <i>voxels</i> e está sinalizado pela cruz. Nele a conectividade aumentou no giro supramarginal, no giro angular, lobo parietal inferior, giro temporal superior e no giro temporal médio. Valores de p não corrigidos, $p < 0,001$	74
Figura 21 - Alterações na conectividade funcional da DMN na condição NPS no contraste paciente sem CLZ > controle. O <i>cluster 2</i> tem 56 <i>voxels</i> e está sinalizado pela cruz. Nele a conectividade aumentou no giro supramarginal, no giro angular, lobo parietal inferior e no giro temporal médio. Valores de p não corrigidos, $p < 0,001$	75
Figura 22 - Alterações na conectividade funcional da DMN na condição NPS no contraste paciente sem CLZ > controle. O <i>cluster 3</i> tem 37 <i>voxels</i> e está sinalizado pela cruz. Nele a conectividade aumentou no pré-cuneus. Valores de p não corrigidos, $p < 0,001$	75
Figura 23 - Alterações na conectividade funcional da DMN na condição NPS no contraste paciente sem CLZ > controle. O <i>cluster 4</i> tem 34 <i>voxels</i> e está sinalizado pela cruz. Nele a conectividade aumentou no giro cingular. Valores de p não corrigidos, $p < 0,001$	75

Figura 24 - Alterações na conectividade funcional da DMN na condição pós-NPS no contraste paciente com CLZ > controle. A conectividade aumentou no lobo parietal inferior, giro supramarginal, giro angular, no giro temporal superior e no giro temporal médio. Valores de p não corrigidos, $p < 0,001$	77
Figura 25 - Alterações na conectividade funcional da DMN na condição pós-NPS no contraste controle > paciente sem CLZ. A conectividade aumentou no giro pós-central. Valores de p não corrigidos, $p < 0,001$	78
Figura 26 - Alterações na conectividade funcional da DMN na condição pós-NPS no contraste paciente sem CLZ > controle. O <i>cluster</i> 1 tem 85 <i>voxels</i> e está sinalizado pela cruz. Nele a conectividade aumentou no giro supramarginal, giro angular, giro temporal superior, giro temporal médio e no lobo parietal inferior. Valores de p não corrigidos, $p < 0,001$	79
Figura 27 - Alterações na conectividade funcional da DMN na condição pós-NPS no contraste paciente sem CLZ > controle. O <i>cluster</i> 2 tem 48 <i>voxels</i> e está sinalizado pela cruz. Nele a conectividade aumentou no giro temporal. Valores de p não corrigidos, $p < 0,001$	80
Figura 28 - Alterações na conectividade funcional da DMN na condição pós-NPS no contraste paciente sem CLZ > controle. O <i>cluster</i> 3 tem 41 <i>voxels</i> e está sinalizado pela cruz. Nele a conectividade aumentou no giro temporal médio, giro temporal inferior e outras regiões. Valores de p não corrigidos, $p < 0,001$	80
Figura 29 - Alterações na conectividade funcional da DMN na condição pós-NPS no contraste paciente sem CLZ > controle. O <i>cluster</i> 4 tem 37 <i>voxels</i> e está sinalizado pela cruz. Nele a conectividade aumentou no giro supramarginal, giro angular e no lobo parietal inferior. Valores de p não corrigidos, $p < 0,001$	80
Figura 30 - Alterações na conectividade funcional da DMN na condição pós-NPS no contraste paciente sem CLZ > controle. O <i>cluster</i> 5 tem 29 <i>voxels</i> e está sinalizado pela cruz. Nele a conectividade aumentou no giro temporal médio e no subgiral. Valores de p não corrigidos, $p < 0,001$	81
Figura 31 - Alterações na conectividade funcional da DMN na condição pós-NPS no contraste paciente sem CLZ > controle. O <i>cluster</i> 6 tem 21 <i>voxels</i> e está sinalizado pela cruz. Nele a conectividade aumentou no giro temporal médio e outras regiões. Valores de p não corrigidos, $p < 0,001$	81
Figura 32 - Valores médios dos mapas estatísticos na região definida pela máscara do córtex auditivo em cada uma das condições (pré-NPS, NPS e pós-NPS). As barras representam o desvio padrão.....	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características clínicas e demográficas dos sujeitos.....	58
Tabela 2 - Medicação antipsicótica em uso pelos portadores de esquizofrenia.....	58
Tabela 3 - Tabela descritiva mostrando as regiões em que a conectividade funcional foi alterada no grupo de pacientes sem CLZ no contraste NPS > pré-NPS.....	60
Tabela 4 - Tabela descritiva mostrando as regiões em que a conectividade funcional foi alterada no grupo de pacientes sem CLZ no contraste pós-NPS > NPS.....	62
Tabela 5 - Tabela descritiva mostrando as regiões em que a conectividade funcional foi alterada no grupo de pacientes com CLZ no contraste pós-NPS > NPS.....	63
Tabela 6 - Tabela descritiva mostrando as regiões em que a conectividade funcional foi alterada no grupo controle no contraste pré-NPS > pós-NPS.....	64
Tabela 7 - Resultados da comparação entre condições (pré-NPS, NPS e pós-NPS) dentro de um mesmo grupo. O * marca em que contrastes foram encontrados diferenças significativas considerando valores de $p < 0,001$ não corrigido.....	65
Tabela 8 - Tabela descritiva mostrando as regiões em que a conectividade funcional foi alterada na condição pré-NPS no contraste controle > pacientes.....	66
Tabela 9 - Tabela descritiva mostrando as regiões em que a conectividade funcional foi alterada na condição pré-NPS no contraste pacientes > controle.....	67
Tabela 10 - Tabela descritiva mostrando as regiões em que a conectividade funcional foi alterada na condição NPS no contraste pacientes > controle.....	69
Tabela 11 - Tabela descritiva mostrando as regiões em que a conectividade funcional foi alterada na condição pós-NPS no contraste pacientes > controle.....	72
Tabela 12 - Resultados da comparação entre grupos pacientes e controle dentro de uma mesma condição. O * marca em que contrastes foram encontrados diferenças significativas considerando valores de $p < 0,001$ não corrigido.....	73
Tabela 13 - Tabela descritiva mostrando as regiões em que a conectividade funcional foi alterada na condição pré-NPS no contraste paciente com CLZ > controle.....	74
Tabela 14 - Tabela descritiva mostrando as regiões em que a conectividade funcional foi alterada na condição NPS no contraste paciente sem CLZ > controle....	76
Tabela 15 - Tabela descritiva mostrando as regiões em que a conectividade funcional foi alterada na condição pós-NPS no contraste paciente com CLZ > controle.....	77

Tabela 16 - Tabela descritiva mostrando as regiões em que a conectividade funcional foi alterada na condição pós-NPS no contraste controle > paciente sem CLZ.....	79
Tabela 17 - Tabela descritiva mostrando as regiões em que a conectividade funcional foi alterada na condição pós-NPS no contraste paciente sem CLZ > controle.....	82
Tabela 18 - Resultados da comparação entre grupos dentro de uma mesma condição. O * marca em que contrastes foram encontrados diferenças significativas considerando valores de $p < 0,001$ não corrigido.....	84

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACC	<i>anterior cingulate cortex</i> (cíngulo anterior)
ACI	análise do componente independente
AMPA	alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico
APQE	ambulatório de esquizofrenia
AREP	ambulatório de reabilitação psicossocial
BOLD	<i>blood oxygen level dependent</i>
BPRS	<i>Brief Psychiatric Rating Scale</i> (escala de avaliação psiquiátrica breve)
CLZ	clozapina
CNS	Conselho Nacional de Saúde
D	direito
DMN	<i>default mode network</i>
DSM-IV	<i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders</i> (Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais)
E	esquerdo
eNOS	óxido nítrico sintase endotelial
EPI	<i>echo planar imaging</i>
FSL	<i>FRMIB Software Library</i>
GL	grau de liberdade
GLM	<i>general linear model</i> (modelo linear geral)
GMPc	monofosfato guanosina cíclico
HCFMRP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
iNOS	óxido nítrico sintase indutível
IPLL	<i>left inferior parietal lobe</i> (lobo parietal inferior esquerdo)
IPLR	<i>right inferior parietal lobe</i> (lobo parietal inferior direito)
MFGL	<i>left middle frontal gyrus</i> (giro frontal médio esquerdo)

mPFC	<i>medial prefrontal cortex</i> (córtex pré-frontal medial)
MK-801	dizocilpina
MTGL	<i>left middle temporal gyrus</i> (giro temporal médio esquerdo)
MTGR	<i>right middle temporal gyrus</i> (giro temporal médio direito)
N	número absoluto
NMDA	N-metil-D-Aspartato
nNOS	óxido nítrico sintase neuronal
NO	óxido nítrico
NPS	nitroprussiato de sódio
P	significância estatística
PA	pressão arterial
PANSS	<i>Positive and Negative Syndrome Scale</i> (escala de síndrome positiva e negativa)
pC	pré-cuneus
PCC	<i>posterior cingulate cortex</i> (cíngulo posterior)
PET	tomografia computadorizada por emissão de pósitrons
REST	<i>Resting-state fMRI data analysis toolkit</i>
RMf	ressonância magnética funcional
ROI	região de interesse
SCA	<i>seed voxel correlation analysis</i>
SNAP	S-nitroso-N-acetilpenicilamina
SNAT	<i>sodium-coupled neutral amino acid transporter</i> (transportador de aminoácido neutro acoplado ao sódio)
SNC	sistema nervoso central
SPM	<i>Statistical Parametric Mapping</i>
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>

t	tempo
<i>t</i>	teste t
TCLE	termo de consentimento livre e esclarecido
USP	Universidade de São Paulo
χ^2	teste do qui-quadrado

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
1.1 Esquizofrenia	21
1.2 Etiologia	21
1.3 Modelos fisiopatológicos	23
1.4 O sistema "NMDA-NO-GMPc"	26
1.5 Nitroprussiato de sódio	28
1.6 Neuroimagem	31
1.7 A <i>Default Mode Network</i>	33
1.8 <i>Default Mode Network</i> e Esquizofrenia	35
2. OBJETIVOS	37
2.1 Objetivo primário	38
2.2 Objetivos secundários	38
3. METODOLOGIA	39
3.1 Sujeitos	40
3.2 Seleção da amostra	40
3.3 Análise estatística das características clínicas e demográficas dos grupos	42
3.4 Instrumentos	43
3.4.1 Entrevista Clínica e Estruturada para o DSM-IV	43
3.4.2 Escala Breve de Avaliação Psiquiátrica (<i>Brief Psychiatric Rating Scale -BPRS</i>)	43
3.5 Drogas	44
3.5.1 Nitroprussiato de sódio	44
3.5.2 Placebo	45
3.6 Procedimento	46
3.6.1 Protocolo experimental	46
3.6.2 Ressonância magnética funcional	47
3.6.3 Aquisição das imagens	48
3.6.4 Pré-processamento e análise das imagens	49
3.7 Aspectos éticos e legais	53

4. RESULTADOS	55
4.1 Características clínicas e demográficas	56
4.2 Análise das imagens	59
4.2.1 Comparação entre condições (pré-NPS, NPS e pós-NPS)	59
4.2.1.1 Grupo de pacientes	59
4.2.1.2 Grupo pacientes sem CLZ	59
4.2.1.3 Grupo pacientes com CLZ	62
4.2.1.4 Grupo controle	63
4.2.2 Comparação entre grupos	65
4.2.2.1 Grupo de pacientes e grupo controle	65
4.2.2.2 Grupo pacientes sem CLZ, grupo pacientes com CLZ e grupo controle	73
4.2.3 Tarefa de escuta passiva	84
5. DISCUSSÃO	86
5.1 Pré-NPS	87
5.2 Efeito do NPS	92
5.3 Tarefa de escuta passiva	97
5.4 Limitações e força do estudo	98
6. CONCLUSÃO	102
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	104
APÊNDICES	129
APÊNDICE A - Termo de consentimento livre e esclarecido	130
APÊNDICE B - Artigo publicado	136
ANEXOS	145
ANEXO A - Comitê de Ética em Pesquisa Médica do HCFMRP-USP	146

INTRODUÇÃO

1. Introdução

1.1 Esquizofrenia

A esquizofrenia é vista hoje como uma doença crônica, frequentemente incapacitante e que afeta cerca de 1% da população mundial, apresentando-se como um dos transtornos psiquiátricos mais graves e um desafio à psiquiatria (Insel, 2010). De maneira geral, a doença se inicia no final da adolescência e início da vida adulta, causando prejuízo importante ao funcionamento individual, social e ocupacional (Schultz e Andreasen, 1999). Diante disso, esse transtorno mental se encontra entre as dez principais causas mundiais de incapacidade ajustada por ano de vida, gerando altos custos ao setor socioeconômico e aos sistemas de saúde (Murray e Lopez, 1996).

A esquizofrenia possui uma apresentação clínica heterogênea, podendo sua psicopatologia se expressar diferentemente entre os indivíduos portadores e também ao longo do curso da doença. Os sinais e sintomas são geralmente classificados em dimensões positiva (alucinações e delírios), negativa (embotamento afetivo, abulia, alogia, anedonia, avolia, apatia), de desorganização (pensamento e comportamento), cognitiva (função executiva, memória e atenção), afetiva (depressão, ansiedade, disforia) e de sintomas motores (postura, maneirismos, estereotípias, catatonia) (Tandon, Nasrallah e Keshavan, 2009).

1.2 Etiologia

No último século, numerosos estudos têm focado a compreensão da doença, entretanto, sua definição precisa, limites, patogênese e causas permanecem desconhecidos (Tandon, 2012). A patogênese não conhecida e a falta de marcadores biológicos resultam em uma desordem efetivamente sindrômica, cujo diagnóstico é baseado em uma combinação de heterofenomenologia e observação clínica (Owen, Williams e O'donovan, 2004). É provável que a esquizofrenia não seja apenas uma doença singular, com diversos fatores etiológicos e processos fisiopatológicos surgindo como relevantes para o desenvolvimento da mesma (Kendell, 1987; Keshavan *et al.*, 2008; Tandon, Keshavan e Nasrallah, 2008; Tandon e Maj, 2008). Ao contrário disso, é quase certo que a nossa construção de esquizofrenia englobe não

apenas uma, mas diversas doenças, na qual a delimitação precisa ainda não é possível (Tandon, Nasrallah e Keshavan, 2009).

Fatores genéticos e ambientais parecem desempenhar um papel na etiologia da doença. A incidência de esquizofrenia é maior nos parentes de pacientes portadores do transtorno em relação à população em geral. Estudos com gêmeos e adoção têm mostrado que esse risco aumentado é genético, com um acréscimo de cerca de dez vezes do risco associado quando há a presença de um familiar de primeiro grau afetado (Tsuang, Gilbertson e Faraone, 1991). O risco genético aumenta a cada familiar afetado, sendo de 50% se ambos os pais foram afetados e de 60-84% se um gêmeo monozigótico for portador do transtorno (Mcguffin, Owen e Farmer, 1995; Cardno *et al.*, 1999). Embora a etiologia da esquizofrenia envolva claramente fatores genéticos, com uma hereditariedade estimada entre 70-85%, cerca de 60% dos portadores de esquizofrenia não possuem parentes de primeiro ou segundo grau afetados pela doença (Gottesman e Erlenmeyer-Kimling, 2001). O grau de concordância de gêmeos monozigóticos para a doença também aponta que a susceptibilidade genética sozinha não é suficiente para a manifestação clínica da mesma. Diante disso, pondera-se que a transmissão genética seja complexa e não siga um padrão simples de herança mendeliana de gene único (Owen, Williams e O'donovan, 2004). É mais provável que existam múltiplos genes de susceptibilidade, cada um com um pequeno efeito e agindo em conjunto com fatores epigenéticos e ambientais (Mueser e Mcgurk, 2004).

Os fatores de risco ambientais para o desenvolvimento da esquizofrenia incluem aspectos biológicos e psicológicos (Mueser e Mcgurk, 2004). O risco está aumentado para eventos pré e perinatais como *influenza* materna, rubéola, desnutrição, diabetes *mellitus*, tabagismo durante a gestação e complicações obstétricas (Susser e Lin, 1992; Takei *et al.*, 1996; Thomas *et al.*, 2001). Alguns fatores sociodemográficos também estão associados ao aumento do risco da doença, tais como a pobreza, baixa classe social e áreas urbanas (Bruce, Takeuchi e Leaf, 1991; Van Os e Marcelis, 1998; Jablensky, 1999).

Diante de todo esse panorama, o atual modelo causal da esquizofrenia se baseia no desenvolvimento da doença como consequência de várias combinações entre fatores genéticos herdados e fatores externos não herdados. Essas associações afetariam a regulação e expressão dos genes responsáveis em governar a função cerebral ou, danificariam diretamente o cérebro. Algumas pessoas podem ter uma predisposição genética que requer a convergência de fatores ambientais adicionais para desencadear a doença. Essa convergência resultaria em

anormalidades no desenvolvimento e maturação cerebral, um processo que está em andamento nas duas primeiras décadas de vida (Armstrong *et al.*, 1995; Andreasen, 1999).

Assim, há um reconhecimento cada vez maior que a esquizofrenia se trate de um transtorno do neurodesenvolvimento (Pilowsky, Kerwin e Murray, 1993; Weinberger, 1996; Lewis e Levitt, 2002). O modelo que surge nessa perspectiva seria que uma alteração ocorrida durante o desenvolvimento cerebral resultaria em uma ruptura no seu funcionamento no final da adolescência ou início da idade adulta e, conseqüentemente, no surgimento dos sintomas clínicos observáveis (Waddington, 1993). Uma das possibilidades consiste que um insulto precoce, durante a gestação ou nos primeiros anos de vida, seria seguido por um período de latência até as fases mais tardias do neurodesenvolvimento. O surgimento dos sintomas psicóticos ocorreria quando os mecanismos de compensação a este insulto precoce não fossem mais suficientes. Uma segunda possibilidade seria que uma alteração no neurodesenvolvimento influenciaria nos caminhos e processos regulatórios, tais como no ajuste fino de sinapses excitatórias e inibitórias do córtex pré-frontal. Essas alterações teriam efeitos sutis até no final da adolescência, quando a partir desse ponto, um equilíbrio maior fosse necessário. Entretanto, com os atuais dados disponíveis, ainda não é possível distinguir entre essas duas possibilidades (Insel, 2010).

1.3 Modelos fisiopatológicos

Apesar da esquizofrenia atualmente ser considerada um transtorno do neurodesenvolvimento, os processos fisiopatológicos fundamentais associados à doença permanecem desconhecidos. Evidências substanciais sugerem que alterações em diversos sistemas de neurotransmissores estariam presentes e levariam ao transtorno (Laruelle, 2014).

Durante muito tempo acreditou-se que a esquizofrenia poderia ser explicada unicamente como produto de uma função dopaminérgica cerebral alterada, sendo o excesso de dopamina uma das teorias mais antigas e difundidas (Van Rossum, 1966; Matthysse, 1973; Meltzer e Stahl, 1976; Meltzer, 1980; Seeman, 1980). A hipótese dopaminérgica surgiu da observação do efeito antipsicótico das medicações, que agiam reduzindo a atividade dopaminérgica através do antagonismo dos receptores de dopamina (subtipo D₂), e dos efeitos psicomiméticos de drogas que aumentavam a atividade dopaminérgica, como a anfetamina (Creese, Burt e Snyder, 1976; Meltzer e Stahl, 1976; Lieberman, Kane e Alvir, 1987; Seeman, 1987). Porém, a principal limitação da hipótese dopaminérgica consiste no fato dessa teoria

focalizar principalmente um dos aspectos da doença, os sintomas positivos. Os sintomas negativos e cognitivos apresentam-se não responsivos ao tratamento com antagonistas dopaminérgicos (Keshavan *et al.*, 2008; Laruelle, 2014).

Nesse contexto, tem se pensado que as evidências de uma transmissão dopaminérgica anormal não seriam a causa primária da esquizofrenia, e sim secundária a anormalidades em outros sistemas regulatórios do tônus dopaminérgico, como no sistema glutamatérgico (Moore, West e Grace, 1999). Assim, complementando a teoria dopaminérgica, a esquizofrenia poderia surgir de anormalidades na neurotransmissão glutamatérgica, uma vez que o glutamato e a dopamina se comodulam (Olney e Farber, 1995; Coyle, 1996; Sesack *et al.*, 2003).

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do córtex cerebral, exercendo seus efeitos através dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos e metabotrópicos (Lindsley *et al.*, 2006). Ele regula processos precoces e fundamentais do desenvolvimento cerebral e tem um papel crítico na neuroplasticidade, neurotoxicidade, no neurodesenvolvimento e na morte neuronal (Behar *et al.*, 1999; Konradi e Heckers, 2003). Inicialmente, foi a observação da redução da concentração de glutamato no líquido cérebro-espinhal de pacientes portadores de esquizofrenia que levou à hipótese glutamatérgica (Kim *et al.*, 1980). Subsequentemente, foi proposto que a esquizofrenia poderia estar relacionada a uma deficiência do glutamato mediada pela hipoatividade de um subtipo ionotrópico de receptor glutamatérgico, o receptor tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) (Olney e Farber, 1995; Moghaddam, 2003; Keshavan *et al.*, 2008). A ativação desse receptor requer a coativação por dois ligantes: glutamato e D-serina ou glicina (Kleckner e Dingledine, 1988). Essa teoria associando a hipoatividade dos receptores NMDA à esquizofrenia surgiu de evidências geradas com agonistas e antagonistas NMDA (Laruelle, 2014). Estudos com fenciclidina e quetamina, antagonistas não-competitivos dos receptores NMDA, mostraram que essas substâncias podiam desencadear sintomas muito semelhantes aos da esquizofrenia, como os sintomas positivos, negativos e cognitivos em voluntários saudáveis e, exacerbar sintomas psicóticos em pacientes esquizofrênicos (Bakker e Amini, 1961; Cohen *et al.*, 1962; Krystal *et al.*, 1994; Malhotra *et al.*, 1997; Adler *et al.*, 1998; Newcomer *et al.*, 1999; Krystal *et al.*, 2003). Essas evidências fortaleceram muito a hipótese glutamatérgica, uma vez que os estudos com substâncias que simulavam a hipótese dopaminérgica, como a anfetamina, aumentavam unicamente a atividade da dopamina, resultando apenas na observação de sintomas positivos, e não de um quadro mais complexo e próximo ao da esquizofrenia (Sayed e Garrison, 1983; Javitt e Zukin,

1991; Javitt, 2010). É importante ressaltar que a hipótese glutamatérgica não contradiz a teoria dopaminérgica e sim, a complementa, visto que a hipoativação NMDA pode ser responsável pela indução de um estado hiperdopaminérgico (Lindsley *et al.*, 2006).

Desta forma, diante das evidências do envolvimento de uma hipoatividade dos receptores NMDA na etiologia da esquizofrenia, buscaram-se drogas que pudessem abordar o sistema glutamatérgico, potencializando a atividade desses receptores e, conseqüentemente, melhorando a sintomatologia positiva, negativa e cognitiva da doença. Compostos com ação direta nos sítios de modulação do receptor NMDA, ou seja, agonistas diretos, apresentaram-se neurotóxicos e com uma série de efeitos colaterais indesejados (Marino e Conn, 2002). Dentre as demais drogas estudadas, temos os inibidores da recaptação da glicina, os coagonistas dos receptores NMDA e os agonistas dos demais receptores glutamatérgicos metabotrópicos e ionotrópicos. Inúmeros estudos com coagonistas NMDA como a glicina, D-serina e D-cicloserina já foram realizados envolvendo amostras pequenas de pacientes, obtendo resultados heterogêneos e, na mais recente revisão, nenhuma superioridade da glicina em relação ao placebo foi comprovada (Tuominen, Tiihonen e Wahlbeck, 2005; Tsai e Lin, 2010; Singh e Singh, 2011; Nunes *et al.*, 2012; Veerman *et al.*, 2014; Zink e Correll, 2015). Os inibidores da recaptação da glicina também falharam até o momento em provar efetividade sobre os sintomas negativos e positivos (Bugarski-Kirola *et al.*, 2014; Koster, Carbon e Correll, 2014). E por fim, estudos com o receptor glutamatérgico ionotrópico alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA) não revelaram benefício na sintomatologia com o uso de um modulador positivo, ampaquine (Piroette *et al.*, 2013). As pesquisas com agonistas dos receptores NMDA para tratamento da esquizofrenia têm produzido resultados inconsistentes até o momento, possivelmente pelo desenvolvimento de uma rápida tolerância a esses compostos, secundária à redução dos receptores NMDA da superfície neuronal (Nong *et al.*, 2003).

Assim, 60 anos após a descoberta do primeiro antipsicótico, o conceito de tratamento antipsicótico ainda depende principalmente de um único mecanismo de ação para psicose: o bloqueio de receptores dopaminérgicos D₂, com ou sem, o bloqueio serotoninérgico (Koster, Carbon e Correll, 2014). Diante do crescente conhecimento da importância da neurotransmissão glutamatérgica na esquizofrenia, assim como, das evidências da hipoativação de um subtipo de receptor, tornou-se essencial o desenvolvimento de novas alternativas farmacológicas que atuassem nesse sistema. Uma vez que, até o momento, estudos com compostos que atuam de forma direta nos receptores NMDA não se mostraram

efetivos, é de extrema relevância buscar caminhos alternativos para acessar a transmissão glutamatérgica via receptor NMDA, como por exemplo, em nível intracelular.

1.4 O sistema “NMDA-NO-GMPc”

Um dos caminhos alternativos relacionados ao receptor do subtipo NMDA tem se constituído em tratamentos com drogas que atuam sobre o óxido nítrico (NO). O NO e seus metabólitos têm sido associados com a esquizofrenia e se encontram estritamente ligados ao funcionamento glutamatérgico (Bernstein, Bogerts e Keilhoff, 2005). O NO é um gás que atua mediando de várias formas a comunicação celular no sistema nervoso central (SNC) (Lowenstein e Snyder, 1992). A implicação do NO no tratamento da esquizofrenia vem do conhecimento que o principal estímulo para disparar a produção deste gás no SNC é a ativação dos receptores NMDA pelo glutamato, sendo a concentração de NO um reflexo da atividade da neurotransmissão glutamatérgica (Akyol *et al.*, 2004). Isso ocorre pois a enzima que sintetiza o NO no SNC, a óxido nítrico sintase neuronal (nNOS), está acoplada a esse subtipo de receptor glutamatérgico (Garthwaite, 1991; Dawson e Snyder, 1994). A ativação dos receptores NMDA pelo glutamato resulta em influxo de cálcio na célula, que se liga à calmodulina e estimula a enzima nNOS a produzir NO pela conversão de L-arginina em L-citrulina. O NO, por sua vez, ativa a enzima guanilato ciclase solúvel que aumenta a produção de monofosfato guanosina cíclico (GMPc). Esta via “NMDA-NO-GMPc” tem demonstrado modular a liberação de neurotransmissores relacionados com a esquizofrenia, tais como a dopamina e o glutamato (Bernstein, Bogerts e Keilhoff, 2005; Oliveira, Zuardi e Hallak, 2008).

Além da nNOS, isoforma constitutiva presente nos neurônios, são conhecidas mais duas formas da enzima responsável pela produção de NO no organismo: uma isoforma constitutiva presente no endotélio (eNOS) e uma isoforma dita indutível (iNOS) expressa em macrófagos, neutrófilos, fibroblastos, músculo liso vascular e células endoteliais em resposta a estímulos patológicos (Snyder e Brecht, 1991). No SNC humano, o NO é predominantemente produzido pela nNOS (Hara *et al.*, 1996).

O NO tem mostrado estar relacionado com a liberação de neurotransmissores, com o aprendizado, a memória e também com neurodesenvolvimento, indo na mesma direção da

teoria atual da etiologia da esquizofrenia (Gally *et al.*, 1990; Lonart, Wang e Johnson, 1992; Hess *et al.*, 1993; Black, Matthews e Humphrey, 1994; Ogilvie *et al.*, 1995; Holscher, 1997). Há evidências que sugerem um papel mais fundamental do NO na eficiência sináptica em várias regiões cerebrais no adulto, e também na sinaptogênese e na maturação neuronal durante o neurodesenvolvimento (Gally *et al.*, 1990).

Duas linhas de evidência sugeriram que o NO, através da elevação do GMPc intracelular, poderia interferir no crescimento neural. Primeiramente, aminoácidos excitatórios que estimulam a produção de NO e conseqüentemente elevam os níveis intracelulares de GMPc, aumentaram o crescimento neural nos neurônios do hipocampo (Brewer e Cotman, 1989; Garthwaite, 1991). A segunda evidência foi a observação do crescimento neural em células de neuroblastoma através do uso de um análogo do GMPc (Zwiller *et al.*, 1977). Foi observado também que os efeitos de um composto doador de NO em culturas neuronais de ratos resultou em neurônios mais longos e uma maior proporção de células neurais em relação a culturas que não receberam o composto (Hindley *et al.*, 1997). Alguns estudos também sugeriram um efeito neuroprotetor do NO através da observação de que um composto doador de NO reduzia substancialmente a toxicidade causada pelo peróxido de hidrogênio em cultura de células (Wink *et al.*, 1993; Chiueh, 1999).

Frente às evidências fortalecendo a importância do NO na etiologia da esquizofrenia, os efeitos das drogas doadoras de NO passaram a ser cada vez mais estudadas. Bujas-Bobanovic *et al.* demonstrou que a administração de nitroprussiato de sódio (NPS), um doador de óxido nítrico, se mostrou capaz de abolir por completo as alterações comportamentais induzidas em ratos tratados com fenciclidina. Esse estudo também demonstrou que o NPS foi capaz de bloquear a expressão proteica do gene *c-fos* induzida pela fenciclidina, sendo essa expressão amplamente reconhecida como uma técnica confiável para identificar populações neuronais de áreas cerebrais metabolicamente ativadas. Desta maneira, o uso de um doador de NO pareceu evitar o problema de diminuição dos receptores NMDA observado anteriormente (Bujas-Bobanovic *et al.*, 2000). Neste mesmo caminho, Yamada *et al.* encontrou que um outro doador de NO, o S-nitroso-N-acetilpenicilamina (SNAP), revertia completamente os efeitos comportamentais em ratos tratados com dizocilpina, conhecida também como MK-801, uma droga com efeitos antagonistas não-competitivos do receptor NMDA semelhantes aos da fenciclidina (Yamada *et al.*, 1996). Além disso, um estudo com molsidomina, outro doador de NO, também mostrou que esse composto foi capaz de atenuar,

em roedores, as alterações comportamentais (estereotípias e ataxia) induzidas pela administração do MK-801 (Pitsikas, Zisopoulou e Sakellariadis, 2006).

Diante da teoria do neurodesenvolvimento e das evidências disponíveis atualmente, a etiologia da esquizofrenia e a neurotransmissão mediada pelo NO tem se aproximado cada vez mais. Em um estudo de revisão sistemática sobre o papel do NO em pacientes com esquizofrenia, inicialmente foram encontrados resultados aparentemente contraditórios. Alguns estudos apontavam para um possível aumento na neurotransmissão mediada pelo NO, enquanto outros indicavam uma diminuição. Entretanto, chegou-se à conclusão que os estudos que apresentavam menos fatores confundidores e possuíam um melhor delineamento, apontavam para um prejuízo na neurotransmissão mediada pelo NO na esquizofrenia (Oliveira, Zuardi e Hallak, 2008). Nesse mesmo sentido, uma metanálise foi realizada objetivando-se avaliar o papel do NO na esquizofrenia através da análise dos níveis plasmáticos/séricos de NO em pacientes diagnosticados com esse transtorno. Esse estudo encontrou níveis mais altos de metabólicos de NO em pacientes em uso de antipsicóticos em relação aos controles, enquanto essa diferença significativa não foi encontrada nos pacientes sem uso de medicação (Maia-De-Oliveira *et al.*, 2012). Essas observações fortalecem ainda mais o papel do NO na etiologia e tratamento da esquizofrenia, sinalizando a importância do mesmo como alvo para o desenvolvimento de novos tratamentos para a doença (Pitsikas, 2015).

Assim, embasando-se nas evidências crescentes de um déficit de NO na esquizofrenia e nos resultados positivos com doadores de NO em modelos animais de esquizofrenia, questionou-se se o NPS, um também doador de NO, poderia ter um efeito benéfico em pacientes portadores desse transtorno mental.

1.5 Nitroprussiato de sódio

O NPS é um vasodilatador direto arterial e venoso que teve seu primeiro uso em humanos descrito em 1928 (Friederich e Butterworth, 1995). Seu uso é indicado em emergências hipertensivas pela sua ação rápida, potente e confiável em reduzir os níveis pressóricos para padrões desejados (Vidt e Gifford, 1984; Cohn, Mcinnes e Shepherd, 2011). O NPS tem seu início de ação imediata, meia-vida curta (um a dois minutos), sofrendo degradação espontânea no organismo em seu metabólito ativo, o NO (Friederich e Butterworth, 1995). O NO ativa a guanilato ciclase, levando à formação de GMPc, estando

esse processo associado ao relaxamento da musculatura lisa vascular (Murad, 1986). A droga é administrada por via endovenosa e a dose de infusão titulada até o efeito hemodinâmico desejado, variando no intervalo de 0,5 - 10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{minuto}$ (Vidt e Gifford, 1984; Cohn, Mcinnes e Shepherd, 2011). Embora o NPS se constitua em um tratamento muito explorado para quadros de hipertensão arterial grave e outras indicações vasculares, seus efeitos no SNC e, particularmente no tratamento da esquizofrenia através da via de neurotransmissão pelo NO, está se fortalecendo recentemente. Reforçando a segurança do uso do NPS, diversos estudos já utilizaram o NPS em voluntários saudáveis, ou seja, não portadores de quadros hipertensivos, não relatando nenhuma intercorrência significativa quando a droga é adequadamente administrada (Schmetterer *et al.*, 1996; Dirnberger *et al.*, 1998; Chowdhary *et al.*, 2000; Sarabi e Lind, 2001).

Após a observação que o NPS foi capaz de abolir por completo as alterações comportamentais e a expressão do *c-fos* cerebral induzidas pela fenciclidina em ratos, Hallak *et al.* foi o primeiro pesquisador a investigar os efeitos da administração desse doador de NO em esquizofrênicos. No ensaio clínico foi realizada a infusão aguda endovenosa contínua de baixas doses de NPS (0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{minuto}$ durante quatro horas) em pacientes portadores de esquizofrenia, hospitalizados, em episódio psicótico agudo e em uso atual de antipsicóticos. Os sintomas positivos, negativos, ansiosos e depressivos foram mensurados através de escalas clínicas durante todo o experimento e nas quatro semanas que se seguiram. Este estudo randomizado, duplo cego, placebo controlado foi o primeiro a demonstrar uma melhora segura, rápida e duradoura de sintomas positivos, negativos, ansiosos e depressivos em pacientes esquizofrênicos após uma única aplicação endovenosa de NPS (Hallak *et al.*, 2013). Os sintomas cognitivos também foram mensurados nessa mesma amostra por uma bateria de testes cognitivos, uma hora antes da infusão da medicação e oito horas após o término da mesma. Os resultados mostraram também uma melhora na performance cognitiva no grupo que recebeu NPS em relação ao placebo (Maia-De-Oliveira, Abrao, *et al.*, 2015).

Diante desses resultados impactantes e duradouros na sintomatologia da esquizofrenia com uma única infusão da medicação, surgiu o questionamento se o NPS, possuindo uma meia-vida curta, poderia estar produzindo efeitos a longo prazo por si só. Nessa direção, Maia-de-Oliveira *et al.* analisou se o NPS, sozinho, administrado em diferentes tempos (12 horas, um dia, dois dias e uma semana) antes da administração de quetamina, poderia prevenir o aparecimento do modelo comportamental da esquizofrenia induzido em ratos. O estudo encontrou que a administração de NPS, até uma semana antes da quetamina, preveniu o

aparecimento de sintomas nos ratos. Esses resultados indicaram pela primeira vez que o NPS pode apresentar efeitos antipsicóticos preventivos e que, essa medicação por si só, possa ser realmente responsável pelos efeitos terapêuticos prolongados de até quatro semanas encontrados em ensaio clínico prévio (Maia-De-Oliveira, Lobao-Soares, *et al.*, 2015). Em um outro estudo, também empregando modelos animais de esquizofrenia induzidos por quetamina, os efeitos de tratamento do NPS em relação à nitroglicerina, um outro doador de NO, mostraram-se mais proeminentes e positivos (Kandratavicius *et al.*, 2015)

O mecanismo de ação antipsicótica do NPS ainda não é conhecido, mas acredita-se que esteja relacionado com a capacidade de modular a via NMDA-NO-GMPc, que estaria alterada na esquizofrenia. O NPS gera NO, aumenta a produção de GMPc e, também tem se apontado que ele possa exercer efeitos modulatórios no receptor NMDA, independentemente da capacidade de gerar NO (Hoyt *et al.*, 1992; Manzoni *et al.*, 1992; Hallak *et al.*, 2013). Além da ação na via glutamatérgica NMDA-NO-GMPc, o NPS tem sido implicado também na neurotransmissão dopaminérgica. Recentemente, um estudo avaliou a ação do NPS nas mudanças da inibição pré-pulso induzidas por anfetamina, uma droga agonista dopaminérgica, em ratos. A deficiência nessa forma fundamental de processo inibitório central é frequentemente observada em pacientes esquizofrênicos (Braff *et al.*, 2001). Nesse sentido, os desfechos demonstraram que o NPS atenuou essas alterações da inibição pré-pulso (Issy *et al.*, 2014). Outra evidência vem a partir da observação que a administração de NPS também produz uma quebra no ciclo sono-vigília em ratos tratados com quetamina, um antagonista NMDA. Esse mesmo padrão de alteração é semelhante ao encontrados em animais depletados de dopamina (Maia-De-Oliveira, Lobao-Soares, *et al.*, 2014).

As interações entre NO e dopamina já vem sendo descritas. Lee et al. relataram níveis reduzidos de NO em pacientes portadores de esquizofrenia em relação aos controles saudáveis. Após seis semanas de tratamento com o antipsicótico risperidona, um antagonista dopaminérgico, os níveis de NO aumentaram e esse aumento foi associado à melhora dos sintomas (Lee e Kim, 2008). Uma metanálise também encontrou que pacientes utilizando antipsicóticos têm níveis plasmáticos de NO mais altos que controles (Maia-De-Oliveira *et al.*, 2012). Nesse mesmo sentido, uma vez que o NO estimula a síntese de GMPc, alguns estudos apontaram um aumento nas concentrações plasmáticas de GMPc nos pacientes portadores de esquizofrenia após o uso de medicações antipsicóticas (Ebstein *et al.*, 1976; Zimmer *et al.*, 1980). Desta forma, tem se pensando que o NO exerça um efeito de tônus

inibitório nos transportadores de dopamina, o que poderia corrigir uma atividade reduzida da dopamina no córtex pré-frontal e, através desse *feedback*, consertar a hiperatividade dopaminérgica no núcleo *accumbens* e corpo estriado (Pycock, Kerwin e Carter, 1980).

Assim, no atual contexto, encontramos o grande impacto dos resultados dos estudos empregando doadores de NO em modelos animais de esquizofrenia e, principalmente, do estudo pioneiro apontando efeitos muito importantes e significativos do NPS na sintomatologia de pacientes portadores de esquizofrenia. Desta forma, abriu-se um campo vasto para aprofundamento e busca de uma maior elucidação dos mecanismos envolvidos, possibilitando o futuro emprego de uma nova linha de tratamento com ação distinta dos atuais antagonistas dopaminérgicos. Objetivando isso, são necessários mais estudos clínicos replicando tais resultados, assim como, é de extrema relevância o uso de técnicas avançadas de avaliação do SNC como a neuroimagem, para o desbravamento desse campo.

1.6 Neuroimagem

A introdução das técnicas de neuroimagem na década de 1960 revolucionou o estudo dos transtornos psiquiátricos e, principalmente, dos mecanismos biológicos ligados a eles. Os grandes avanços nas últimas décadas da tecnologia não - invasiva de imagem do SNC compreenderam técnicas estruturais (tomografia computadorizada e ressonância magnética) e funcionais (tomografia por emissão de fóton único, tomografia por emissão de pósitrons, ressonância magnética funcional, espectroscopia por ressonância magnética e imagem por tensor de difusão) (Abou-Saleh, 2006; Mcguire *et al.*, 2008). Como resultado, conquistamos ferramentas para o estudo estrutural e funcional *in vivo* e, conseqüentemente, para uma maior compreensão da neurobiologia dos transtornos psiquiátricos.

O advento da imagem funcional levou a uma nova fase de descobertas no campo da fisiopatologia das patologias mentais e mecanismos de ação de drogas para tratamento, especialmente, na esquizofrenia. Dentre as técnicas de neuroimagem funcional, a ressonância magnética funcional (RMf) ganhou grande destaque, possuindo vantagens importantes como mínima invasividade, nenhuma radioatividade, avaliação ampla e sem limitação para repetições (Sharma, 2003).

A RMf é uma técnica sensível ao estado hemodinâmico cerebral, tendo o atributo de mensurar indiretamente as alterações na atividade neural por meio das variações de

oxigenação, fluxo e volume sanguíneo cerebral (Wise e Preston, 2010). A metodologia mais amplamente empregada é a baseada no contraste BOLD (*blood oxygen level dependent*), na qual o sinal para obtenção da imagem é altamente influenciado pelo estado de oxigenação do sangue na região cerebral (Tracey, 2001). As variações do sinal BOLD originam-se das variações da quantidade de desoxihemoglobina no tecido, e não diretamente do nível de oxigênio. Isso ocorre pois é a desoxihemoglobina que possui a natureza paramagnética de interferir no campo magnético e levar a uma redução local da homogeneidade do campo, funcionando como um contraste (Norris, 2006). Assim, a RMf baseada no contraste BOLD é capaz de produzir mapas de ativação funcional com alta resolução espacial e temporal em resposta a tarefas perceptivas, cognitivas e emocionais e também durante o repouso (Lucignani e Bastianello, 2007).

Estudos demonstraram que a neuroimagem funcional em humanos pode detectar mudanças na atividade cerebral desencadeadas pela administração de drogas como a apomorfina, cocaína, fenfluramina, quetamina e nicotina, o que despertou um interesse crescente do uso da RMf em estudos farmacológicos (Grasby *et al.*, 1993; Lahti *et al.*, 1995; Breiter *et al.*, 1997; Meyer, Kennedy e Brown, 1998; Stein *et al.*, 1998; Leslie e James, 2000). Nesse contexto, a fármaco - RMf mediada pelo contraste BOLD investiga as alterações na atividade cerebral desencadeadas pela administração aguda e crônica de uma droga, localizando as mudanças funcionais sequencialmente em tempo real (Shah e Marsden, 2004). Os resultados fornecem informações sobre a fisiologia cerebral e mecanismos neurofarmacológicos que, por sua vez, são muito úteis em estudos pré-clínicos de medicações novas, análises de resposta e na investigação de modelos fisiopatológicas dos transtornos psiquiátricos (Lucignani e Bastianello, 2007).

Assim, partindo-se da hipótese glutamatérgica de que os sintomas da esquizofrenia sejam devidos, ao menos em parte, a uma disfunção na neurotransmissão mediada pelo NO, o NPS, por ser uma droga doadora de NO, provavelmente corrigiria essa disfunção exercendo seus efeitos terapêuticos. Nosso grupo de pesquisa já obteve resultados importantes na melhora da sintomatologia após uma única aplicação de NPS em pacientes portadores de esquizofrenia. Nesse caminho, estudos que investigassem através de técnicas de neuroimagem funcional os efeitos do NPS no SNC de pacientes portadores de esquizofrenia, seriam ferramentas de grande impacto para o conhecimento dos mecanismos e efeitos farmacológicos dessa medicação.

1.7 A *Default Mode Network*

Ao longo das últimas décadas, muitos estudos de neuroimagem têm encontrado evidências *in vivo* da desconectividade na esquizofrenia, ou seja, uma integração funcional anormal entre regiões cerebrais estaria presente nesse transtorno (Bullmore, Frangou e Murray, 1997; Stephan, Baldeweg e Friston, 2006; Stephan, Friston e Frith, 2009). As teorias sobre a presença de uma desconectividade na esquizofrenia já estavam presentes desde as primeiras descrições da fenomenologia da doença no século XIX por Bleuler, que enfatizavam a desconexão entre afeto, cognição e comportamento, e estenderam-se até as mais recentes observações de ruptura das redes neurais (Mcglashan, 2011; Karbasforoushan e Woodward, 2012).

As redes neurais são formadas por regiões cerebrais distintas espacialmente mas funcionalmente conectadas, trocando entre si, informações de forma contínua (Friston, 1994; Van Den Heuvel e Hulshoff Pol, 2010). O termo conectividade funcional é usado para descrever as correlações da atividade neural entre essas regiões anatomicamente distintas que constituem as redes neurais, tanto no estado de repouso (*resting state*), como durante o processamento de algum estímulo externo (Zhou, Thompson e Siegle, 2009). O advento da RMf e do sinal BOLD possibilitou a mensuração de forma indireta da atividade cerebral através das mudanças nos níveis de oxigenação cerebral. Desta forma, por meio das correlações temporais entre as flutuações do sinal BOLD nas regiões anatomicamente conhecidas podemos avaliar a conectividade funcional (Horwitz, 2003; Fox e Raichle, 2007).

Na última década, o estado de repouso tem se configurado como um tema recorrente nos estudos envolvendo neuroimagem. Atualmente, a RMf em *resting state* é a principal ferramenta de imagem em muitos estudos investigando a conectividade funcional no cérebro humano (Lowe, 2012). A aquisição das imagens é realizada em repouso, sem a necessidade de um estímulo ou tarefa, durante a qual ocorre a detecção das flutuações de baixa frequência do sinal BOLD (Khanna *et al.*, 2015). Objetivando mensurar o nível de atividade cerebral espontânea, os voluntários podem permanecer com os olhos fechados ou abertos, com a presença ou não de um ponto de fixação visual e são orientados a relaxar e não pensar em nada específico (Snyder e Raichle, 2012). Esses estudos têm revelado novos achados sobre a conectividade funcional de áreas específicas cerebrais e também de redes neurais, provendo

descobertas sobre a organização global da comunicação funcional cerebral (Van Den Heuvel e Hulshoff Pol, 2010).

Dentro desse panorama atual de estudos de neuroimagem funcional, uma das redes neurais mais estudadas é nomeada *default mode network* (DMN). Raichle et al., foi quem introduziu pela primeira vez esse conceito ao descrever, através do uso da tomografia computadorizada por emissão de pósitrons (PET), áreas cerebrais que apresentavam um padrão de menor atividade durante a performance de tarefas que demandassem atenção e, durante o *resting state*, apresentavam maior atividade funcional. As regiões descritas como pertencentes à DMN foram o precúneo, o cíngulo posterior, o córtex pré-frontal medial e lobo parietal inferior (Raichle et al., 2001). Áreas cerebrais adicionais, como o córtex temporal lateral e a formação hipocampal, também podem ser identificadas como parte desta rede, porém, a partir de uma observação menos robusta que as demais regiões envolvidas (Buckner, Andrews-Hanna e Schacter, 2008b). Devido ao aparente antagonismo entre tarefa e ativação, a DMN também pode ser conhecida como "tarefa negativa", (Broyd et al., 2009; Whitfield-Gabrieli e Ford, 2012). Enquanto durante o *resting state*, ela apresenta uma maior ativação, refletindo assim uma alta conectividade funcional entre as regiões (Raichle e Snyder, 2007).

Apesar dos numerosos estudos investigando as bases neurais da DMN, pouco ainda se compreende sobre suas funções. De maneira geral, a atividade da DMN tem sido relacionada a diversos processos mentais internos como a autorreferência, introspecção, memórias autobiográficas, pensamentos associativos e previsões (Gusnard e Raichle, 2001; Fox et al., 2005a; Bar et al., 2007; Spreng, Mar e Kim, 2009). Durante os momentos passivos, quando não temos demanda para nos engajar no ambiente externo, nossa mente divaga (Antrobus et al., 1970; Smallwood e Schooler, 2006). Essas observações direcionam à ideia de que a DMN se ativa durante os estados cognitivos passivos, quando o pensamento está voltado para o interior, levantando a hipótese dessa rede neural estar associada à cognição espontânea. A rede de regiões implicada na DMN está, funcionalmente e anatomicamente, ligada a estruturas límbicas, sugerindo um circuito que tenha acesso a informações mnemônicas. Frente a essa possibilidade, propõe-se que a DMN possa dar suporte a construção de modelos mentais internos baseados em sistemas mnemônicos. Essa teoria pode explicar a frequente observação de aumento da atividade da DMN tanto em tarefas passivas, nas quais a mente é liberada para divagar, como durante tarefas cognitivas, quando os sujeitos são orientados a lembrar de fatos do passado ou planejar mentalmente um hipotético evento futuro. Sendo

assim, atualmente a DMN tem sido implicada em processos mentais importantes, principalmente ligados à geração de pensamentos internamente (Buckner, 2013).

1.8 Default Mode Network e Esquizofrenia

Diante do fato que muitos transtornos mentais são marcados por alterações nos processos internos de pensamento ou prejuízo na memória, ambas funções associadas à DMN, essa rede tem sido cada vez mais estudada nesse contexto. A esquizofrenia pode oferecer um exemplo clínico intrigante da alteração do funcionamento da DMN uma vez que, entre outros sintomas, esse transtorno mental está associado à importante desorganização do pensamento (Buckner, 2013). Assim, o estudo da DMN na esquizofrenia vem ocupando um campo vasto e crescente de investigação, principalmente diante da hipótese da desconectividade se constituir em um dos possíveis mecanismos fisiopatológicos da doença.

Nos últimos anos, alterações na conectividade da DMN têm sido relacionadas a esquizofrenia, entretanto, os resultados obtidos têm se apresentado muito heterogêneos. Diversos estudos apontam para uma maior conectividade funcional da DMN durante o *resting state* na esquizofrenia (Zhou *et al.*, 2007; Whitfield-Gabrieli *et al.*, 2009; Mannell *et al.*, 2010; Skudlarski *et al.*, 2010; Woodward, Rogers e Heckers, 2011; Mingoia *et al.*, 2012; Tang *et al.*, 2013; Chang *et al.*, 2014; Alonso-Solis *et al.*, 2015; Kindler *et al.*, 2015). Porém, uma outra parcela importante dos estudos aponta na direção oposta, ou seja, da presença de uma menor conectividade dessa rede nos pacientes portadores de esquizofrenia (Bluhm *et al.*, 2007; Rotarska-Jagiela *et al.*, 2010; Camchong *et al.*, 2011; Alonso-Solis *et al.*, 2012; Liemburg *et al.*, 2012; He *et al.*, 2013; Kasperek *et al.*, 2013; Khadka *et al.*, 2013; Manoliu, Riedl, Doll, *et al.*, 2013; Orliac *et al.*, 2013; Meda *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014). Somando-se a esses achados, alguns estudos também apontam a presença simultânea de regiões da DMN com maior conectividade e outras com menor conectividade em pacientes (Ongur *et al.*, 2010; Manoliu, Riedl, Zherdin, *et al.*, 2013; Razavi *et al.*, 2013).

Apesar da heterogeneidade nos achados dos estudos que investigam a DMN, a existência de uma alteração na conectividade dessa rede neural na esquizofrenia já pode ser tomada como uma conclusão preliminar a respeito da literatura atual. Desta forma, se faz

necessária a busca de maior conhecimento sobre essas alterações, assim como, de maiores evidências sobre a desconectividade nesse transtorno mental. Em última análise, espera-se que a caracterização da desconectividade funcional na esquizofrenia possa levar à identificação de biomarcadores relacionados a fenótipos clínicos e comportamentais, etiologia, tratamento e prognóstico (Karbasforoushan e Woodward, 2012). Por fim, a observação do efeito de uma potencial nova droga para tratamento da esquizofrenia sobre o funcionamento da DMN, pode nos auxiliar muito na elucidação de sua ação terapêutica e também no conhecimento que temos a respeito dessa importante rede neural.

Assim, no presente estudo, pretendemos avaliar por RMf mediada pelo contraste BOLD, a conectividade funcional da DMN em resposta à administração aguda endovenosa de NPS em indivíduos sadios e esquizofrênicos, buscando assim, uma maior compreensão dos efeitos terapêuticos importantes dessa medicação já observados.

Levamos a hipótese de que a administração de NPS poderá atenuar as alterações observadas na conectividade da DMN nos pacientes portadores de esquizofrenia quando comparados aos voluntários saudáveis.

OBJETIVOS

2. Objetivos

2.1 Objetivo primário

- Avaliar os efeitos agudos da administração de NPS na conectividade funcional da rede DMN através da RMf mediada pelo contraste BOLD em pacientes portadores de esquizofrenia e em voluntários saudáveis.

2.2. Objetivos secundários

- Determinar se o NPS possui efeitos diferenciados em portadores de esquizofrenia e voluntários saudáveis.

- Determinar se o NPS possui efeitos diferenciados nos pacientes portadores de esquizofrenia de acordo com a medicação antipsicótica em uso.

- Determinar quais as regiões da DMN apresentam alterações significativas da conectividade funcional durante a infusão do NPS e após a mesma.

METODOLOGIA

3. Metodologia

3.1 Sujeitos

Foram incluídos 35 pacientes portadores de esquizofrenia, segundo os critérios do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais da Associação Americana de Psiquiatria (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders DSM-IV*), que se apresentavam estáveis clinicamente e em seguimento ambulatorial no serviço de psiquiatria do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP). Também foram incluídos 20 voluntários saudáveis.

3.2 Seleção da amostra

Os voluntários portadores de esquizofrenia foram selecionados e convidados a participar da pesquisa após consulta de rotina no ambulatório de reabilitação psicossocial (AREP) ou no ambulatório de esquizofrenia (APQE) do serviço de psiquiatria do HCFMRP-USP. Os voluntários saudáveis foram selecionados e convidados a participar da pesquisa a partir de uma população de universitários. Na ocasião do convite, os voluntários e seus familiares, quando necessário, foram informados e esclarecidos quanto às características e implicações do experimento, devendo assinar o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (APÊNDICE A) (conforme Resolução nº. 196/96 sobre pesquisa envolvendo seres humanos do Ministério da Saúde), apresentado em formulário padrão do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto. Foi ressaltado também que a não aceitação em participar do estudo não traria qualquer implicação aos que se encontravam em acompanhamento clínico no serviço.

Após a aceitação em participar do estudo, todos os voluntários, saudáveis ou portadores de esquizofrenia, foram submetidos a exames laboratoriais (hemograma completo, função hepática, função renal, eletrocardiograma, eletrólitos, função tireoidiana, dosagem de vitamina B12) para a exclusão de qualquer condição médica geral que pudesse contraindicar a inclusão do sujeito no presente experimento.

Os voluntários tiveram que atender os seguintes critérios:

Pacientes

Crítérios de inclusão:

- Indivíduos do sexo masculino;
- Idade entre 18 e 50 anos;
- Diagnóstico de esquizofrenia pelo DSM-IV;
- Apresentar quadro estável da doença, sem reagudização nas últimas quatro semanas;
- Estar em uso estável de antipsicóticos, sem qualquer mudança nas medicações psicotrópicas nas últimas quatro semanas.

Critérios de exclusão:

- Presença de condição médica geral relevante (doenças cardiovasculares, doenças neurológicas, insuficiência renal, doença hepática, hipotireoidismo, hiponatremia, hipovitaminose B12);
- História de hipersensibilidade ao NPS;
- Diagnóstico de abuso ou dependência de substâncias psicoativas segundo os critérios do DSM-IV;
- Presença de marca-passo ou qualquer prótese metálica.

O total de 35 voluntários portadores de esquizofrenia incluídos no estudo foi dividido em dois grupos de acordo com a medicação antipsicótica que estava em uso, conforme representado na figura 1. O grupo sem clozapina (CLZ) reuniu os pacientes em uso de antipsicóticos típicos e/ou atípicos, exceto CLZ, e o grupo com CLZ agrupou os pacientes em uso dessa medicação antipsicótica.

Voluntários saudáveis**Critérios de inclusão:**

- Indivíduos do sexo masculino;
- Idade entre 18 e 50 anos;
- Não possuir histórico de doença psiquiátrica, baseado na Entrevista Clínica Estruturada para o DSM-IV;
- Não ter feito uso de qualquer medicação psicotrópica no período de três meses anteriores ao estudo;
- Não possuir histórico de trauma crânio-encefálico.

Critérios de exclusão:

- Presença de condição médica geral relevante (doenças cardiovasculares, doenças neurológicas, insuficiência renal, doença hepática, hipotireoidismo, hiponatremia, hipovitaminose B12);
- História de hipersensibilidade ao NPS;
- Diagnóstico de abuso ou dependência de substâncias psicoativas segundo os critérios do DSM-IV;
- Presença de marca-passo ou qualquer prótese metálica.

O total de 20 voluntários saudáveis incluídos no estudo foi dividido em dois grupos controles, conforme representado na figura 1. Um grupo controle com 15 sujeitos realizou o mesmo protocolo experimental de imagem e infusão de NPS dos voluntários portadores de esquizofrenia. Já um controle grupo com cinco sujeitos realizou um protocolo de tarefa de escuta passiva e infusão de NPS com a finalidade de descartar que as alterações da conectividade da DMN fossem somente secundárias a um efeito vasodilatador da medicação.

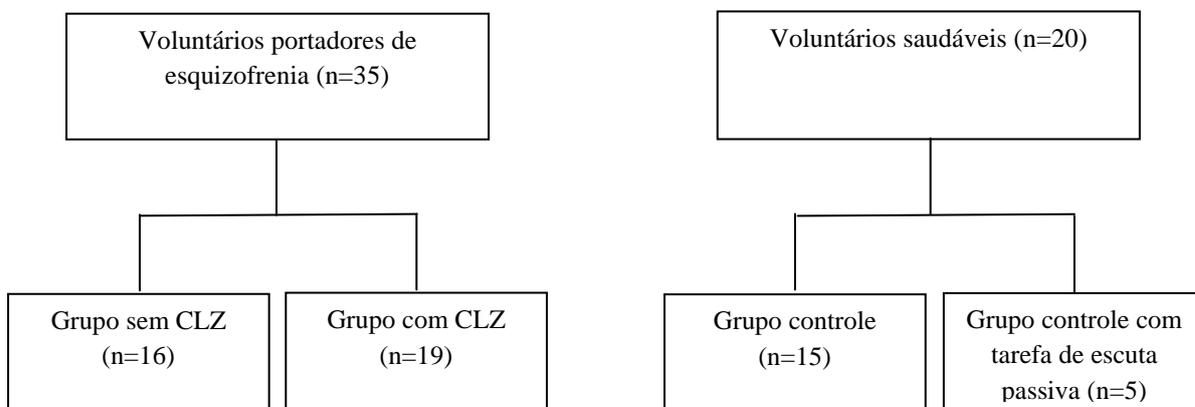


Figura 1 - Fluxograma da seleção e divisão dos voluntários incluídos.

3.3 Análise estatística das características clínicas e demográficas dos grupos

Para a análise de dados, utilizou-se estatística descritiva para a apresentação das características clínicas e demográficas dos grupos de voluntários. A análise estatística foi realizada utilizando-se o “*Statistical Package for the Social Sciences*” (SPSS), versão 22.0. Foram consideradas diferenças estatisticamente significativas quando $p \leq 0,05$.

A análise de variância (ANOVA) foi realizada para a comparação entres as médias de idade dos grupos sem CLZ, com CLZ e controle, seguido de teste *post-hoc* de Tukey. O teste *t*

para variáveis independentes foi aplicado para a comparação da média de tempo de doença, tempo sem tratamento após o primeiro episódio psicótico, tempo de uso da medicação atual e tempo em uso da dose atual da medicação entre os grupos sem CLZ e com CLZ. O teste *t* para amostras independentes também foi realizado para a comparação dos valores médios da Escala de Avaliação Psiquiátrica Breve (*Brief Psychiatric Rating Scale* - BPRS) pré-NPS e pós-NPS entre os grupos portadores de esquizofrenia. Objetivando a avaliação do efeito do NPS sobre os valores pré e pós-BPRS dentro de cada grupo de pacientes, aplicou-se o teste *t* pareado. Antes da realização dos testes *t*, a homogeneidade das variâncias foi testada pelo teste de Levene. A escolaridade dos voluntários categorizada foi comparada pelo teste do *qui-quadrado*.

3.4 Instrumentos

3.4.1 Entrevista Clínica Estruturada para o DSM - IV:

Foi utilizada para triagem e confirmação diagnóstica a Entrevista Clínica Estruturada para o DSM-IV, versão clínica - SCID-CV (First *et al.*, 1997), traduzida e adaptada para o português (Del-Ben *et al.*, 2001). Com a aplicação desse instrumento, confirmou-se o diagnóstico de esquizofrenia dos pacientes selecionados e excluiu-se qualquer doença psiquiátrica nos voluntários saudáveis.

3.4.2 Escala Breve de Avaliação Psiquiátrica (*Brief Psychiatric Rating Scale* - BPRS):

Para avaliar as alterações psicopatológicas nos portadores de esquizofrenia antes e após o experimento foi utilizada a Escala de Avaliação Psiquiátrica Breve - *Brief Psychiatric Rating Scale* (BPRS) (Overall e Gorham, 1962), modificada por Bech (Bech, Kastrup e Rafaelsen, 1986), traduzida e adaptada para o português (Zuardi *et al.*, 1994).

Essa versão é composta por 18 itens da escala original desenvolvida (Overall e Gorham, 1962). Cada item foi pontuado pelo mesmo entrevistador treinado no uso da mesma, com escore variando entre zero (mínimo - ausente) e quatro (máximo – presente o tempo todo ou durante a maior parte do tempo).

3.5 Drogas

3.5.1 Nitroprussiato de sódio

Nipride® (Biolab Sanus): pó liofilizado para infusão endovenosa. Cinquenta e cinco frascos - ampola contendo 50 mg de NPS dihidratado em cada frasco, e o mesmo número de ampolas de diluente com 2 ml cada foram utilizadas em todo o experimento.

O NPS foi utilizado em infusão endovenosa contínua controlada através de bomba de infusão em dose de 0,25 µg/kg/minuto, com monitorização rigorosa de cada voluntário. Poderia ocorrer redução da dose ou interrupção da infusão caso fossem observadas alterações significativas da pressão arterial (PA) ou de outros parâmetros hemodinâmicos do voluntário.

É importante ressaltar que normalmente as doses necessárias para se obter uma resposta clinicamente adequada para o controle da PA são variáveis e devem ser tituladas, dependendo da idade do paciente e da intensidade de efeito desejado. A maioria dos pacientes hipertensos responde a uma infusão entre 0,5 a 10 µg/kg/minuto (Vidt e Gifford, 1984).

Cada ampola com 50 mg da droga foi diluída em 2ml de diluente e adicionada a 500 ml de soro glicosado 5%, com concentração final de 0,1 mg/ml. Como a substância é sensível à luz, foram empregadas soluções preparadas imediatamente antes do início do experimento, sendo o frasco e o equipo envoltos com material opaco.

Além do NO, o NPS gera espontaneamente o cianeto. Este último é metabolizado no fígado em tiocianato através de reação catalisada pela rodonase, que utiliza íons tiosulfatos como doadores de enxofre (Himwich e Saunders, 1948; Ivankovich, Miletich e Tinker, 1978; Kulig, 1992). Teoricamente, esta reação pode ser revertida pela enzima tiocianato oxidase presente nos eritrócitos mas, a termodinâmica favorece de forma predominante a formação de tiocianato (Pines e Crymble, 1952; Ivankovich, Miletich e Tinker, 1978). O tiocianato é excretado intacto pela via renal. Em sua grande maioria, os adultos conseguem metabolizar 50 mg de NPS a partir dos estoques de enxofre no organismo. Fatores como desnutrição, cirurgias e diuréticos, podem reduzir esses estoques, diminuindo essa capacidade. Raramente, quando a infusão ultrapassa o tolerado ou quando a metabolização se torna insuficiente, radicais cianeto podem se acumular e causar uma intoxicação clínica (Ivankovich *et al.*, 1983; Curry e Arnold-Capell, 1991).

O excesso de radicais cianeto pode se ligar aos citocromos mitocondriais, levando ao bloqueio da respiração celular aeróbica e resultar em anóxia tecidual, metabolismo anaeróbico, acidose láctica grave e morte celular (Curry e Arnold-Capell, 1991; Hall e Guest, 1992). Existem controvérsias sobre a verdadeira incidência da toxicidade clinicamente significativa por cianeto. Nesse sentido, argumentos para a redução do uso do NPS são encontrados simultaneamente a estudos que demonstram nenhuma evidência de toxicidade clínica mesmo após vários dias de infusão da droga (Friederich e Butterworth, 1995).

Independentemente da taxa de infusão ou da dose total administrada, qualquer paciente recebendo NPS que posteriormente apresente disfunção do SNC, instabilidade cardiovascular e aumento da acidose metabólica, deve ser avaliado para intoxicação por cianeto. A infusão de NPS deve ser interrompida e as demais intervenções devem ser realizadas de acordo com a condição do quadro clínico (Curry e Arnold-Capell, 1991; Hall e Guest, 1992).

O tiocianato formado também pode causar intoxicação em pacientes com prejuízo da excreção renal. A meia-vida normal de eliminação renal de tiocianato é de 2,7 dias, mas ela pode ser prolongada para até nove dias em pacientes com insuficiência renal. A toxicidade pelo tiocianato é rara, sendo cem vezes menos tóxico que o cianeto. Sintomas inespecíficos de intoxicação incluem fadiga, zumbido, náusea, vômito, podendo evoluir para hiperreflexia, confusão mental, psicose, miose e, em quadros mais graves, convulsões e coma. Esses efeitos são minimizados assim que a infusão da droga é interrompida ou a sua velocidade de eliminação é aumentada (Curry e Arnold-Capell, 1991; Hall e Guest, 1992).

Contraindicações médicas para o uso do NPS são raras e em grande parte teóricas. É possível que o risco de toxicidade por cianeto seja maior em indivíduos com anormalidades na via cianeto - tiocianato e com menor disponibilidade da enzima hepática rodonase. Pacientes com atrofia hereditária do nervo óptico (Doença de Leber) ou ambliopia tóxica apresentam maior risco de toxicidade pelo cianeto, já que possuem uma anormalidade no metabolismo do mesmo (Tinker e Michenfelder, 1976; Cohn e Burke, 1979; Friederich e Butterworth, 1995). Além disso, a droga deve ser utilizada com prudência em pacientes com hepatopatias, nefropatias, hipertensão intracraniana, doença cerebrovascular ou doença coronariana (Friederich e Butterworth, 1995).

3.5.2 Placebo

O Placebo se constituiu de soro glicosado 5%.

3.6 Procedimento

Os voluntários portadores de esquizofrenia e saudáveis foram recebidos no setor de radiologia localizado no segundo andar do HCFMRP-USP. No dia anterior ao estudo, os indivíduos foram orientados a não ingerirem bebida alcoólica e a realizarem um desjejum leve antes de comparecerem ao experimento.

Os indivíduos portadores de esquizofrenia foram avaliados clinicamente através da BPRS e, posteriormente, encaminhados para a entrevista com a equipe de enfermagem, na qual também foi realizada a pesagem e aferição de dados vitais. Os voluntários saudáveis foram encaminhados diretamente para a avaliação da enfermagem, não sendo submetidos, portanto, à BPRS. Em seguida, os voluntários foram preparados e submetidos ao experimento conforme descrição detalhada abaixo. Finalizado o experimento, os voluntários saudáveis foram liberados, enquanto os pacientes portadores de esquizofrenia foram novamente avaliados através da BPRS e, posteriormente, liberados.

O procedimento para a realização do experimento se iniciou com a introdução de uma cânula venosa no antebraço direito do voluntário, na qual foram conectados o equipo e a solução de NPS dissolvida e instalada na bomba de infusão. Outra cânula venosa foi introduzida no antebraço esquerdo e conectada ao equipo e ao soro glicosado 5%. O voluntário foi posicionado no equipamento de ressonância magnética funcional e a monitorização cardiorespiratória instalada. Um esfigmomanômetro posicionado na porção distal do membro inferior esquerdo foi programado para aferir a PA a cada três minutos. A frequência cardíaca e os níveis de saturação de oxigênio também foram monitorados continuamente através do oxímetro posicionado no segundo quirodáctilo esquerdo. Os voluntários foram orientados a permanecer relaxados, sem pensar em nada específico e de olhos fechados. Finalizado o posicionamento e a disposição dos equipamentos de monitorização, iniciou-se a infusão venosa simultaneamente à aquisição das imagens através da RMf.

3.6.1 Protocolo experimental

Grupo de pacientes sem CLZ, grupo de pacientes com CLZ e grupo controle:

Cada indivíduo, fosse voluntário saudável ou voluntário portador de esquizofrenia, foi submetido a uma única sessão do estudo de imagem e de infusão da droga experimental, sendo esse procedimento idêntico entre os grupos sem CLZ, com CLZ e grupo controle sem tarefa de escuta passiva, conforme representado na figura 2. A aquisição das imagens se iniciou com a infusão de soro glicosado 5% no antebraço esquerdo por cerca de 12 minutos. A partir do décimo segundo minuto, a infusão de soro glicosado 5% foi finalizada e, imediatamente, o voluntário passou a receber a solução de NPS através da bomba de infusão instalada no acesso venoso do antebraço direito. Após 12 minutos, a infusão da droga experimental foi interrompida e o voluntário novamente passou a receber a infusão de soro glicosado 5% por seis minutos, finalizando o experimento.

Grupo controle com tarefa de escuta passiva:

O grupo controle com tarefa de escuta passiva foi submetido a um protocolo de infusão de soro glicosado 5% e NPS porém, ao invés de permanecerem todo o período de aquisição das imagens em repouso, foram submetidos a uma tarefa de escuta passiva capaz de aumentar a atividade do córtex auditivo primário. Os estímulos foram apresentados por meio de fones supra-aurais compatíveis com o equipamento de ressonância magnética. Durante a tarefa, os voluntários foram orientados a escutar atentamente a uma história complexa apresentada simultaneamente para ambas as orelhas. Os sujeitos foram instruídos a permanecer com os olhos fechados, não se movimentar durante todo o exame e a voltar o máximo possível de sua atenção para a tarefa de escuta.

A tarefa de escuta passiva foi realizada utilizando-se um protocolo em bloco de escuta passiva que consistia de cinco blocos de repouso e quatro blocos de tarefa (escuta passiva), alternados e com duração de dez segundos cada, conforme representado na figura 4. Esse protocolo foi repetido sob três condições distintas: antes, durante e após a administração do NPS.

3.6.2 Ressonância Magnética funcional

Conforme representado na figura 2, no tempo zero (t_0), juntamente com a infusão do soro glicosado 5%, o protocolo de aquisição das imagens foi iniciado com aquisição

volumétrica ponderada em T1 (3DT1) e seguida por RMf em estado de repouso por seis minutos. No t12, ao mesmo tempo que a infusão de soro glicosado foi substituída pela infusão de NPS (0,25 µcg/kg/min), as imagens funcionais em estado de repouso foram realizadas por mais 12 minutos. No t24, após a substituição da infusão de NPS por soro glicosado 5%, iniciou-se a aquisição volumétrica ponderada em T2 (3DT2), seguida por nova aquisição funcional em repouso por mais seis minutos. No t35 ocorreu o término da aquisição das imagens e da infusão venosa e os voluntários foram auxiliados para saírem do posicionamento dentro do equipamento. A monitorização cardiorespiratória foi retirada, assim como as cânulas venosas desconectadas.

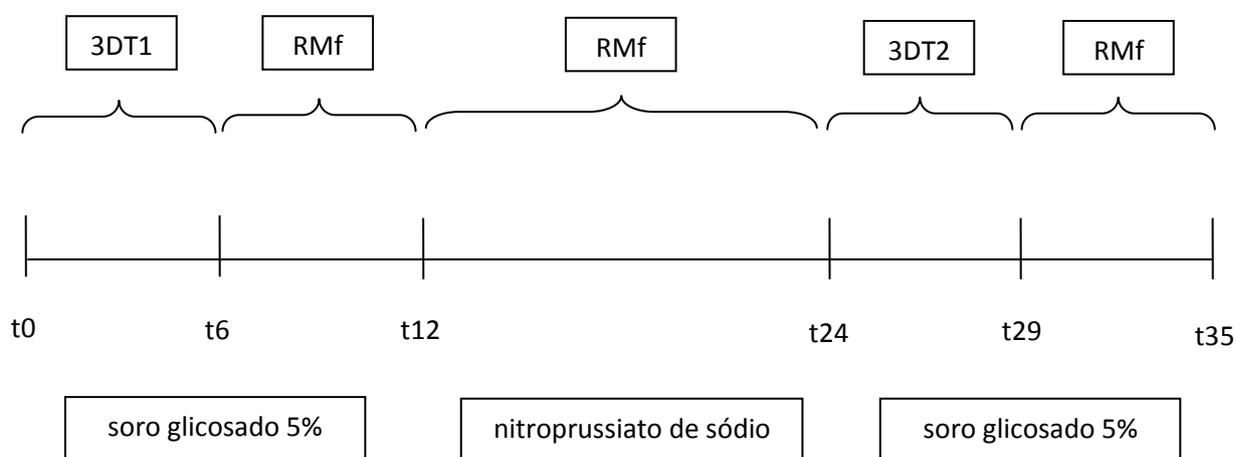


Figura 2 - Representação do procedimento de infusão da droga experimental e aquisição das imagens.

3.6.3 Aquisição das imagens

Todas as imagens foram adquiridas em um tomógrafo Philips 3.0 T Achieva (Philips, Best, Holanda), utilizando uma bobina de crânio SENSE de oito canais. As imagens anatômicas utilizaram uma sequência do tipo gradiente eco, ponderada em T1 (TR = 6.7 ms, TE= 3.1 ms, ângulo de *flip* = 8, matriz = 256 X 256, FOV = 256 mm; número de fatias: 180; espessura da fatia = 1 mm, dimensão do *voxel* = 1 x 1 x 1 mm³, SENSE = 1). Já as imagens funcionais utilizaram uma sequência do tipo ecoplanar (EPI – *Echo Planar Imaging*), cobrindo ambos os hemisférios cerebrais, com os seguintes parâmetros: TR = 3000 ms, TE = 30 ms, ângulo de *flip* = 90°, matriz = 128 x 128, FOV = 230 mm, número de fatias = 32, espessura da fatia = 2 mm, SENSE = 2.

A análise de conectividade funcional da rede neural DMN foi feita nos três grupos de sujeitos (15 controles, 19 pacientes em uso da medicação antipsicótica CLZ e 16 pacientes em

uso de outros antipsicóticos, exceto a CLZ), cada um deles sob três condições diferentes: antes (pré-NPS), durante (NPS) e após a administração do NPS (pós-NPS).

3.6.4 Pré-processamento e análise das imagens

Inicialmente os dados foram pré-processados no programa de uso livre FSL (FMRIB *Software Library*), versão 5.0, (*Analysis Group FMRIB, Oxford, United Kingdom*), seguindo a sequência proposta por Weissenbacher et al. (Weissenbacher *et al.*, 2009) para calcular a conectividade funcional baseada em *seeds* (*seed voxel correlation analysis – SCA*).

O pré-processamento dos dados contemplou a correção de movimento e a correção temporal entre as fatias, utilizando as rotinas *mcflirt* e *slicetimer* (Jenkinson *et al.*, 2002), e a suavização espacial aplicando um filtro gaussiano com FWHM de 5 mm. Para assegurar a qualidade dos dados analisados, os parâmetros de movimento (translação e rotação) foram inspecionados em cada sujeito e em cada condição (pré-NPS, NPS e pós-NPS) para garantir que em nenhum deles excedia 2 mm de translação e/ou 1° de rotação. Os sujeitos que tiveram parâmetros superiores a esses limites em alguma das condições, foram excluídos da análise.

Em seguida, as imagens foram transformadas para o espaço padrão MNI 152 com a finalidade de mapear o cérebro de todos os indivíduos dentro de uma estrutura cerebral normalizada. Para tanto foi utilizada a rotina *flirt* (Jenkinson e Smith, 2001; Jenkinson *et al.*, 2002), que realiza apenas transformações lineares.

Após essa etapa, utilizamos o SPM5 (*Statistical Parametric Mapping, Wellcome Institute of Cognitive Neurology, London, United Kingdom*) para fazer a regressão linear entre a série temporal de cada sujeito e 18 confundidores, para evitar a possibilidade de correlações espúrias: seis parâmetros de correção de movimento (três rotações e três translações), o sinal global, o sinal da substância branca, o sinal do fluido cerebrospinal e suas respectivas derivadas. As imagens resíduo (parte do sinal que não foi relacionada com os confundidores) obtidas após a regressão foram utilizadas para a análise de conectividade funcional.

Sobre as imagens resíduo foi feita a análise de conectividade funcional utilizando o programa REST (*Resting-state fMRI Data Analysis Toolkit*, versão 1.7, (Song *et al.*, 2011).

Em primeiro lugar, os dados foram filtrados por um passa-banda de 0,01 a 0,1 Hz. Duas *seeds*, uma no córtex do cíngulo posterior (PCC - *posterior cingulate cortex*) e outra no córtex pré-frontal medial (mPFC - *medial prefrontal cortex*), foram definidas da seguinte forma: esferas de 10 mm de raio, centradas nas coordenadas MNI do PCC (-4, -47, 45) e do mPFC (0, 51, -14) (Fox *et al.*, 2005b). A figura 3 ilustra a localização das *seeds*. As séries temporais médias de cada *seed* foram obtidas e os mapas de correlação foram produzidos computando-se o coeficiente de correlação de Pearson entre a série temporal de cada *voxel* e a série média da *seed*. Finalmente, os mapas de coeficiente de correlação foram convertidos em mapas de *z-score* aplicando-se a transformada de Fisher para garantir uma distribuição normal dos dados.

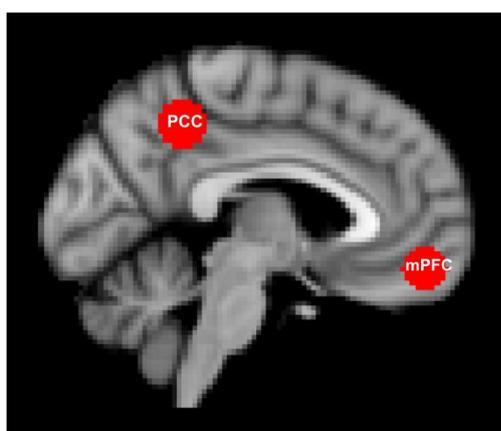


Figura 3 - Localização das duas *seeds* (em MNI) utilizadas na análise da conectividade funcional: PCC (-4, -47, 45) e mPFC (0, 51, -14).

Realizamos a comparação entre o grupo controle e o grupo de pacientes (sem uso de CLZ + com uso de CLZ) para cada condição (pré-NPS, NPS e pós-NPS) aplicando o *two sample t-test* usando os contrastes controle > paciente e paciente > controle. Também foi aplicado o teste *t* de *Student* pareado para revelar as diferenças entre os padrões de conectividade funcional de cada condição (pré-NPS, NPS e pós-NPS) em cada grupo (controle, paciente sem CLZ e paciente com CLZ). Os mapas de *z-score* das duas *seeds* foram comparados ao mesmo tempo. As três condições foram comparadas dois a dois para cada um dos grupos: pré-NPS vs. NPS, NPS vs. pós-NPS e pré-NPS vs. pós-NPS.

Nesse momento, procuramos por diferenças apenas nas regiões que compõem a DMN, utilizando uma máscara formada por 11 regiões de interesse (ROI): cíngulo anterior (ACC), cíngulo posterior (PCC), pré-cuneus (pC), córtex pré-frontal medial (mPFC), giro frontal médio esquerdo (MFGL), giro temporal médio direito (MTGR) e esquerdo (MTGL), lobo parietal inferior direito (IPLR) e esquerdo (IPLL), formação hipocampal (hipocampo + giro

parahipocampal) direita e esquerda (Buckner, Andrews-Hanna e Schacter, 2008a; Laird *et al.*, 2009).

Além disso, foi feita uma análise comparando os três grupos dois a dois para cada condição: pré-NPS controle vs. pré-NPS pacientes sem CLZ, pré-NPS controle vs. pré-NPS pacientes com CLZ, pré-NPS pacientes sem CLZ vs. pré-NPS pacientes com CLZ, durante NPS controle vs. durante NPS pacientes sem CLZ, durante NPS controle vs. durante NPS pacientes com CLZ, durante NPS pacientes sem CLZ vs. durante NPS pacientes com CLZ, pós-NPS controle vs. pós-NPS pacientes sem CLZ, pós-NPS controle vs. pós-NPS pacientes com CLZ, pós-NPS pacientes sem CLZ vs. pós-NPS pacientes com CLZ. As comparações foram feitas usando ANOVA com $p < 0,001$ não corrigido e, novamente, utilizamos uma máscara da DMN para procurar por diferenças apenas dentro dessa rede.

As imagens do protocolo de escuta passiva também foram pré-processados no programa de uso livre FSL, versão 5.0. Nessa etapa foram feitas correção de movimento, correção temporal entre as fatias e a suavização espacial aplicando um filtro gaussiano com FWHM de 5 mm. Para assegurar a qualidade dos dados analisados, os parâmetros obtidos na correção de movimento foram inspecionados em cada sujeito e em cada condição (pré-NPS, NPS e pós-NPS) para garantir que em nenhum deles os movimentos excedessem 2 mm de translação e 1° de rotação. Em seguida, para efeito de normalização, as imagens foram transformadas para o espaço padrão MNI. Foi utilizada a rotina *flirt* (Jenkinson e Smith, 2001; Jenkinson *et al.*, 2002), que realiza apenas transformações lineares, para fazer o corregristo das imagens anatômicas e funcionais com o *template* MNI 152.

Após essa etapa, utilizamos o SPM5 para análise estatística dos dados utilizando os seguintes passos:

- I. Criação da matriz de design do GLM (*general linear model*). Essa matriz retrata o desenho experimental. Nesse caso, o desenho experimental consistia de um protocolo contendo cinco blocos de repouso e quatro blocos de tarefa (escuta passiva), alternados e com duração de dez segundos cada (figura 4);
- II. Estimativa dos parâmetros do GLM;
- III. Construção dos mapas estatísticos baseados nos contrastes escolhidos (escuta > repouso e repouso > escuta) em cada uma das condições (pré-NPS, NPS e pós-NPS);

IV. Comparação dos mapas estatísticos entre as condições. Foi aplicado o teste *t* de *Student* pareado para revelar as diferenças no contraste escuta > repouso. As três condições foram comparadas duas a duas para cada um dos grupos de sujeitos: pré-NPS vs. NPS, NPS vs. pós-NPS e pré-NPS vs. pós-NPS. Como nosso objetivo era avaliar o córtex auditivo, utilizamos uma máscara contendo as áreas de Brodmann 41, 42 e 22 nas comparações entre as condições (Figura 5).

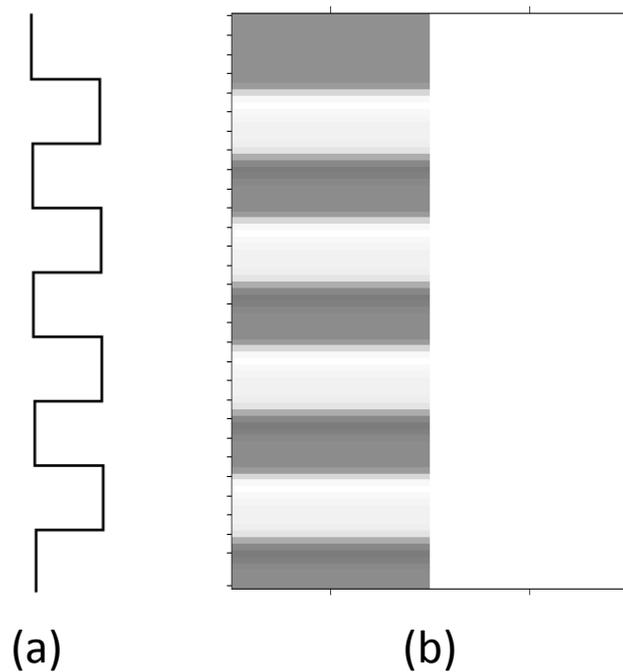


Figura 4 - (a) Desenho experimental do protocolo - cinco blocos de repouso e quatro blocos de escuta passiva, alternados e com duração de dez segundos. (b) Matriz de design do *general linear model*. A coluna 1 contém o modelo do sinal BOLD (*blood oxygen level dependent*) do protocolo e a coluna 2 representa uma constante.

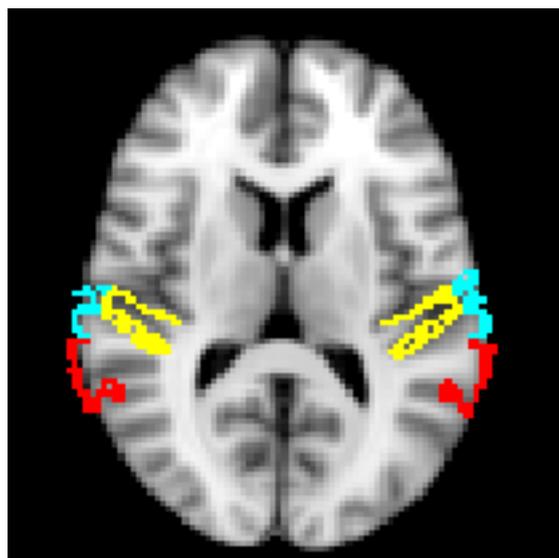


Figura 5 - Máscara do córtex auditivo contruída anatomicamente a partir das áreas de Brodmann 41 (amarelo), 42 (azul) e 22 (vermelho).

3.7 Aspectos éticos e legais

O estudo aqui apresentado foi submetido para apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa Médica do HCFMRP-USP, segundo processo n° 14278/2011 (ANEXO A). Após avaliação, foi aprovado juntamente com o TCLE para voluntário portador de esquizofrenia e voluntário saudável, que constam no apêndice A. O estudo realizado também está de acordo com a resolução Conselho Nacional de Saúde (CNS) 196/96.

Os sujeitos que preenchiam os critérios necessários para constituir a amostra do presente estudo foram convidados a participar da pesquisa, sendo esta, absolutamente voluntária. Foi assegurado ao sujeito na ocasião do convite, que haveria total liberdade de retirar seu consentimento em qualquer momento do transcorrer da pesquisa sem que isso lhe trouxesse alguma implicação negativa. Do mesmo modo, a não participação no estudo não acarretaria em qualquer prejuízo na continuidade do seu tratamento na instituição.

Para todos os voluntários saudáveis e pacientes portadores de esquizofrenia foi lido o TCLE e fornecidas informações sobre a justificativa, objetivos, procedimentos, riscos e benefícios do estudo ao qual foram convidados a participar. Somente foram aceitos no estudo sujeitos que assinaram o TCLE.

A todos os voluntários foram garantidos os direitos de receber informações e esclarecimentos a respeito de qualquer dúvida que surgisse no transcorrer do procedimento, assim como informações atualizadas sobre o estudo, mesmo que isso pudesse afetar sua vontade de continuar participando. Da mesma forma, foi garantida a segurança de não serem identificados, bem como de que todas as informações fornecidas por eles seriam mantidas sob caráter confidencial.

RESULTADOS

4. Resultados

Do total de 35 voluntários portadores de esquizofrenia alocados em dois grupos de acordo com a medicação antipsicótica em uso, três pacientes foram excluídos do grupo sem CLZ e seis pacientes do grupo com CLZ em razão dos artefatos de movimento excederem 2 mm de translação e 1° de rotação. Por sua vez, dos 20 voluntários saudáveis divididos em grupo controle e grupo controle com tarefa, um sujeito foi excluído do grupo controle pela presença de artefato de movimento (Figura 6).

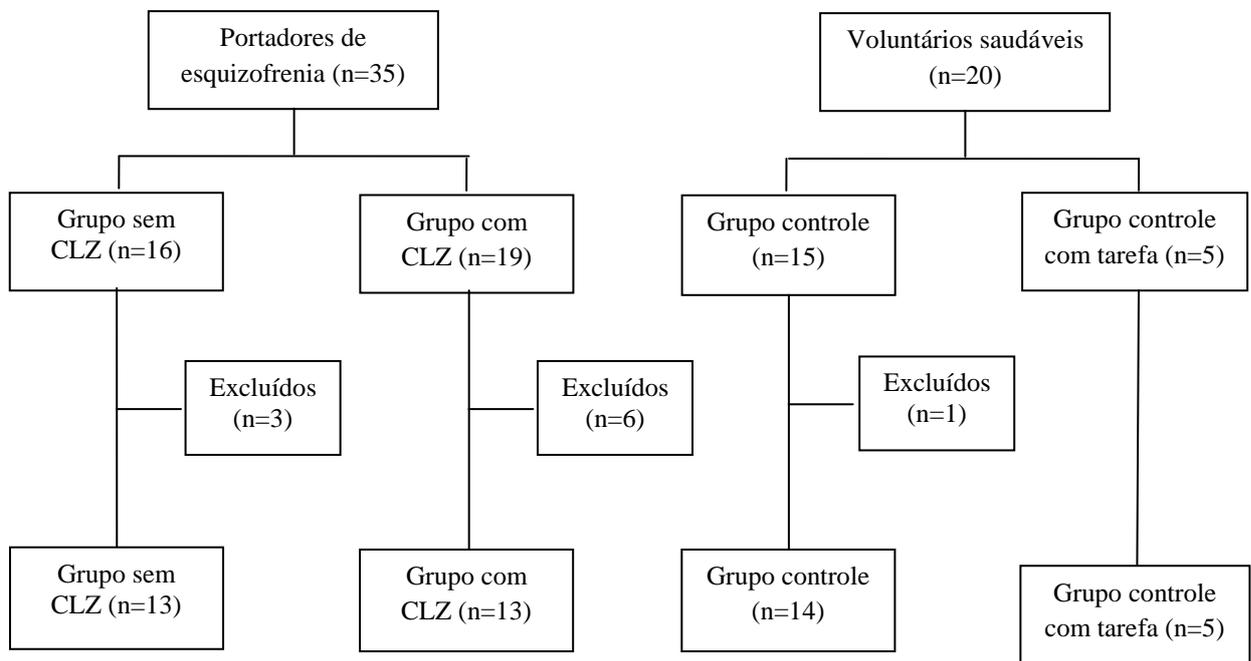


Figura 6 - Fluxograma representando a exclusão dos voluntários por artefato de movimento.

4.1 Características clínicas e demográficas

As características clínicas e demográficas dos pacientes portadores de esquizofrenia e voluntários saudáveis estão apresentadas na tabela 1. Analisando a variável idade, observamos que o grupo sem CLZ apresentou maior valor para idade média ($F_{2,39}=6,46$ $p<0,01$), sendo significativamente maior comparado ao grupo controle mas sem diferença em relação ao grupo com CLZ.

Em relação ao nível de escolaridade, a maior parte dos pacientes de ambos os grupos, sem CLZ e com CLZ, possuíam de 4 a 11 anos de estudo e, estatisticamente, não foi encontrada diferença nessa variável ($\chi^2=1,67$; $GL = 2$; $p=0,43$). Entretanto, quando comparamos o grupo de pacientes sem CLZ e com CLZ aos controles, verificamos

escolaridade significativamente maior nos voluntários saudáveis que se submeteram ao mesmo protocolo experimental que os pacientes ($\chi^2 = 23,38$; GL = 4; $p < 0,01$). Não foram encontradas diferenças significativas em relação ao número de sujeitos destros e canhotos em todos os grupos de voluntários, uma vez que a grande maioria era destra.

Analisando as variáveis relacionadas apenas aos pacientes portadores de esquizofrenia, não foram encontradas diferenças significativas nas variáveis tempo de doença ($t = -0,11$; GL = 1; $p = 0,91$), tempo sem tratamento após o primeiro episódio psicótico ($t = -0,59$; GL = 1; $p = 0,56$), tempo de introdução da medicação atual ($t = 0,59$; GL = 1; $p = 0,56$) e tempo em uso da dose atual da medicação ($t = 1,13$; GL = 1; $p = 0,28$) entre os grupos. Ainda em relação a comparação entre os grupos de pacientes sem e com CLZ, foram encontradas diferenças estatisticamente significativas dos valores médios da BPRS pré-NPS e pós-NPS entre os grupos, ($t = 2,04$; GL = 24; $p = 0,05$) e ($t = 2,04$; GL = 24; $p = 0,05$) respectivamente. Entretanto, não observamos mudanças significativas entre os valores médios da BPRS pré-NPS e pós-NPS em cada grupo de pacientes, ($t = -1,00$; GL = 12; $p = 0,34$) ($t = -0,56$; GL = 12; $p = 0,58$) respectivamente.

As medicações antipsicóticas usadas pelos grupos sem CLZ e com CLZ estão apresentadas na tabela 2. No grupo sem CLZ, dois pacientes estavam em uso de dois antipsicóticos ao mesmo tempo, haloperidol decanoato e quetiapina; e olanzapina e risperidona, respectivamente. Além do uso de antipsicóticos, alguns pacientes estavam em uso de inibidores seletivos da recaptção de serotonina ($n = 4$), benzodiazepínicos ($n = 5$), estabilizador de humor ($n = 1$), anticolinérgico ($n = 1$) e anti-histamínico ($n = 3$). No grupo com CLZ, além do uso do antipsicótico clozapina, alguns pacientes estavam em uso de ácido valpróico ($n = 4$), inibidores seletivos da recaptção de serotonina ($n = 4$), antidepressivo tricíclico ($n = 1$) e benzodiazepínicos ($n = 1$).

Tabela 1 - Características clínicas e demográficas dos sujeitos.

	Portadores de esquizofrenia		Voluntários saudáveis	
	Grupo sem CLZ n=13	Grupo com CLZ n=13	Grupo controle n=14	Grupo controle com tarefa n=5
Idade (anos)	36 ± 5,8	32,8 ± 6	29,1 ± 2,3*	29,2 ± 2,94
Escolaridade (n)			*	
<4 anos	3	1	0	0
4-11 anos	8	8	0	0
>11 anos	2	4	14	5
Destro/Canhoto	10/3	12/1	13/1	4/1
Tempo de doença (anos)	15,3 ± 8,8	15,7 ± 7,7	----	----
Tempo sem tratamento após 1º episódio (meses)	4,8 ± 9,3	9,9 ± 25	----	----
Tempo de introdução da medicação atual (meses)	61,6 ± 55,8	50 ± 41,8	----	----
Tempo na dose atual da medicação (meses)	32,3 ± 43,2	18,1 ± 13,5	----	----
BPRS pré-NPS	6,3 ± 4,5	10,8 ± 6,6 *	----	----
BPRS pós-NPS	6,5 ± 4,2	10,9 ± 6,5 *	----	----

CLZ: clozapina, n: número absoluto, AP: antipsicóticos, NPS: nitroprussiato de sódio, BPRS: *Brief Psychiatric Rating Scale*, *: p≤0,05,

Tabela 2 - Medicação antipsicótica em uso pelos portadores de esquizofrenia.

Medicação/dose	Grupo sem CLZ n=13	Grupo com CLZ n=13
Clozapina (n=13)	----	517,3 ± 196,2 mg/dia
Haloperidol decanoato (n=2)	150mg/4 semanas	----
Risperidona (n=1)	4mg/dia	----
Quetiapina (n=3)	566,7 ± 251,7 mg/dia	----
Paliperidona injetável LP (n=1)	150mg/ 3 semanas	----
Olanzapina (n=8)	15 ± 8,4 mg/dia	----

CLZ: clozapina, n:número absoluto de pacientes, LP: liberação prolongada

4.2 Análise das imagens

4.2.1 Comparação entre condições (pré-NPS, NPS e pós-NPS)

Para a observação das alterações na conectividade funcional entre as condições em cada grupo, foram utilizados seis contrastes: pré-NPS > NPS, NPS > pré-NPS, NPS > pós-NPS, pós-NPS > NPS, pré-NPS > pós-NPS e pós-NPS > pré-NPS. Foram considerados apenas *clusters* com mais de 20 *voxels*.

Primeiramente, consideramos para análise o grupo formado pelo total de pacientes (sem uso de CLZ + com uso de CLZ):

4.2.1.1 Grupo de pacientes

No grupo de pacientes (sem uso de CLZ + com uso de CLZ) não foram encontradas diferenças significativas entre as condições pré-NPS, NPS e pós-NPS.

Posteriormente, consideramos os grupos de pacientes de acordo com a medicação em uso:

4.2.1.2 Grupo pacientes sem CLZ

No grupo de pacientes que não estavam fazendo uso da CLZ foram encontradas diferenças no contraste NPS > pré-NPS e no pós-NPS > NPS.

NPS > pré-NPS:

A figura 7 mostra as regiões em que padrão de conectividade se altera, observando-se aumento na conectividade do cuneus e do pré-cuneus ($p < 0,001$ não corrigido). A tabela 3 descreve detalhadamente o resultado obtido.

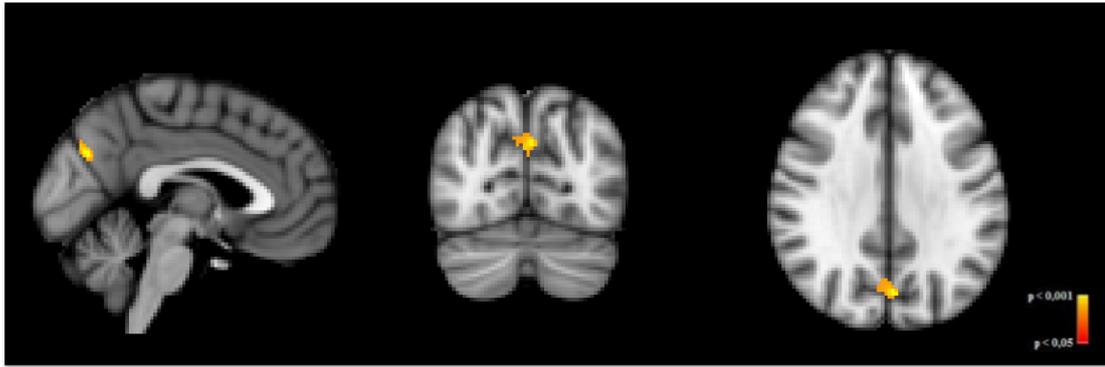


Figura 7 - Alterações na conectividade funcional da DMN no grupo de pacientes sem CLZ no contraste NPS > pré-NPS. A conectividade aumentou no cuneus e no pré-cuneus. Valores de p não corrigidos, $p < 0,001$.

Tabela 3 (continua) - Tabela descritiva mostrando as regiões em que a conectividade funcional foi alterada no grupo de pacientes sem CLZ no contraste NPS > pré-NPS.

Cluster 1	
Número de <i>voxels</i> : 104	
Máx. coordenadas: -2, -72, 32	
Região anatômica	% da região nessa localização
Não identificada	5,77
Cuneus (E)	10,58
Cuneus (C)	5,77
Cuneus (D)	15,38
Pré-cuneus (E)	10,58
Pré-cuneus (C)	14,42
Pré-cuneus (D)	37,50
Não identificada	43,27
Substância cinzenta (E)	16,35
Substância cinzenta (D)	26,92
Substância branca (E)	4,81
Substância branca (D)	8,65
Não identificada	56,73
Área de Brodmann 7 (E)	14,42

Tabela 3 (conclusão) - Tabela descritiva mostrando as regiões em que a conectividade funcional foi alterada no grupo de pacientes sem CLZ no contraste NPS > pré-NPS.

Cluster 1	
Número de <i>voxels</i> : 104	
Máx. coordenadas: -2, -72, 32	
Região anatômica	% da região nessa localização
Área de Brodmann 7 (D)	23,08
Área de Brodmann 31 (E)	1,92
Área de Brodmann 31 (D)	3,85

máx.: máxima, D: direito, E: esquerdo, C: central, %: porcentagem.

Pós-NPS > NPS

A figura 8 mostra as regiões nas quais o padrão de conectividade se altera, observando-se aumento na conectividade do subgiral, do giro temporal inferior e do giro temporal médio ($p < 0,001$ não corrigido). A tabela 4 descreve detalhadamente o resultado obtido.

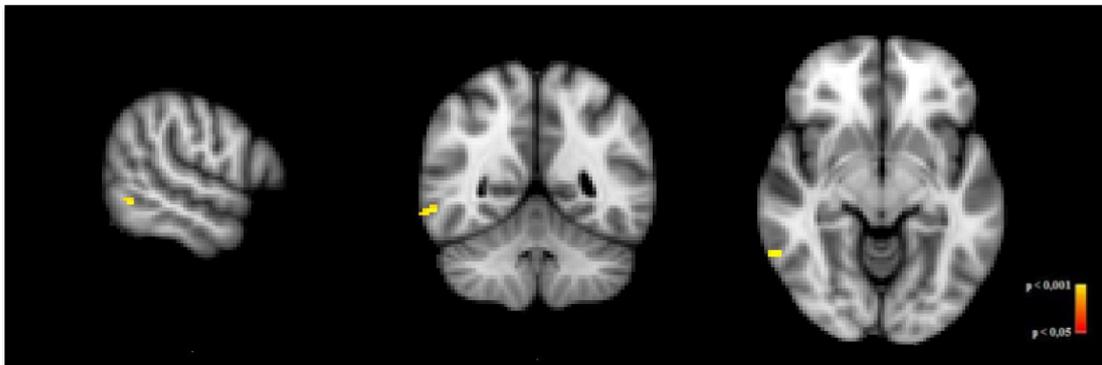


Figura 8 - Alterações na conectividade funcional da DMN no grupo de pacientes sem CLZ no contraste pós-NPS > NPS. A conectividade aumentou no subgiral, giro temporal inferior e no giro temporal médio. Valores de p não corrigidos, $p < 0,001$.

Tabela 4 - Tabela descritiva mostrando as regiões em que a conectividade funcional foi alterada no grupo de pacientes sem CLZ no contraste pós-NPS > NPS.

Cluster 1	
Número de <i>voxels</i> : 20	
Máx. coordenadas: 64, -54, -10	
Região anatômica	% da região nessa localização
Subgiral (D)	15,00
Giro temporal inferior (D)	35,00
Giro temporal médio (D)	50,00
Não identificado	5,00
Substância cinzenta (D)	40,00
Substância branca (D)	55,00
Não identificado	60,00
Área de Brodmann 21 (D)	30,00
Área de Brodmann 37 (D)	10,00

máx.: máxima, D: direito, %: porcentagem.

4.2.1.3 Grupo pacientes com CLZ

No grupo de pacientes que estavam fazendo uso do CLZ foram encontradas diferenças no contraste pós-NPS > NPS.

Pós-NPS > NPS

A figura 9 mostra as regiões em que padrão de conectividade se altera, observando-se aumento na conectividade do giro frontal superior ($p < 0,001$ não corrigido). A tabela 5 descreve detalhadamente o resultado obtido.

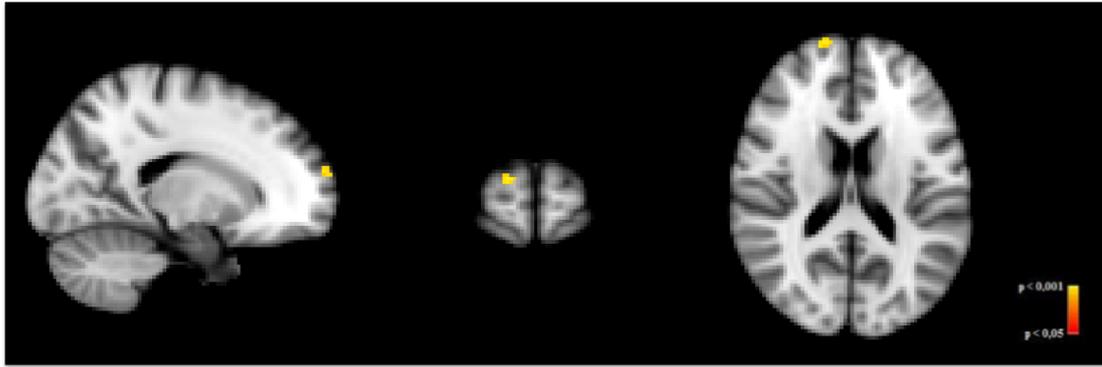


Figura 9 - Alterações na conectividade funcional da DMN no grupo de pacientes com CLZ no contraste pós-NPS > NPS. A conectividade aumentou no giro frontal superior. Valores de p não corrigidos, $p < 0,001$.

Tabela 5 - Tabela descritiva mostrando as regiões em que a conectividade funcional foi alterada no grupo de pacientes com CLZ no contraste pós-NPS > NPS.

<i>Cluster 1</i>	
Número de <i>voxels</i> : 21	
Máx. coordenadas: 16, 66, 18	
Região anatômica	% da região nessa localização
Não identificado	9,52
Giro frontal superior (D)	90,48
Não identificado	14,29
Substância cinzenta (D)	57,14
Substância branca (D)	28,57
Não identificado	42,86
Área de Brodmann 10 (D)	57,14

máx.: máxima, D: direito, %: porcentagem.

4.2.1.4 Grupo controle

No grupo controle foram encontradas diferenças entre o contraste pré-NPS > pós-NPS. A figura 10 mostra as regiões em que padrão de conectividade se altera, observando-se

aumento na conectividade do giro temporal médio ($p < 0,001$ não corrigido). A tabela 6 descreve detalhadamente o resultado obtido.

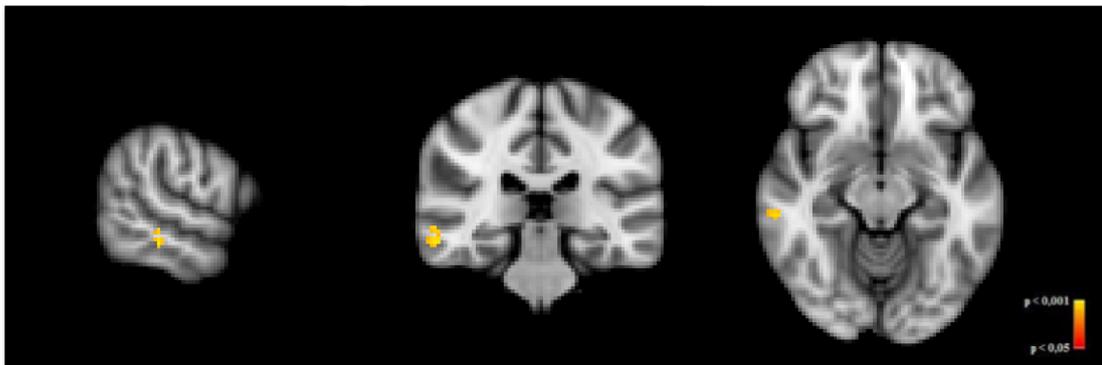


Figura 10 - Alterações na conectividade funcional da DMN no grupo controle no contraste pré-NPS > pós-NPS. A conectividade aumentou no giro temporal médio. Valores de p não corrigidos, $p < 0,001$.

Tabela 6 - Tabela descritiva mostrando as regiões em que a conectividade funcional foi alterada no grupo controle no contraste pré-NPS > pós-NPS.

Cluster 1	
Número de <i>voxels</i> : 30	
Máx. coordenadas: 60, -30, -14	
Região anatômica	% da região nessa localização
Giro temporal médio (D)	100,00
Substância cinzenta (D)	26,67
Substância branca (D)	73,33
Não identificado	73,33
Área de Brodmann 21 (D)	26,67

máx.: máxima, D: direito, %: porcentagem.

A tabela 7 resume os resultados encontrados na comparação entre as condições pré-NPS, NPS e pós-NPS em cada grupo.

Tabela 7 - Resultados da comparação entre condições (pré-NPS, NPS e pós-NPS) dentro de um mesmo grupo. O * marca em que contrastes foram encontrados diferenças significativas considerando valores de $p < 0,001$ não corrigido.

	Controle	Pacientes (sem CLZ + com CLZ)	Pacientes sem CLZ	Pacientes com CLZ
pré-NPS > NPS				
NPS > pré-NPS			*	
NPS > pós-NPS				
pós-NPS > NPS			*	*
pré-NPS > pós-NPS	*			
pós-NPS > pré-NPS				

CLZ: clozapina, NPS: nitroprussiato de sódio

4.2.2 Comparação entre grupos

4.2.2.1 Grupo de pacientes e grupo controle

Para a observação de alterações da conectividade funcional entre as condições nesses dois grupos, utilizamos os contrastes controle > pacientes e pacientes > controle. Foram considerados apenas *clusters* com mais de 20 *voxels*.

Pré-NPS

Controle > Pacientes

A figura 11 mostra as regiões em que padrão de conectividade se altera, observando-se a existência de apenas um *cluster* ($p < 0,001$ não corrigido). A tabela 8 descreve detalhadamente o resultado obtido.

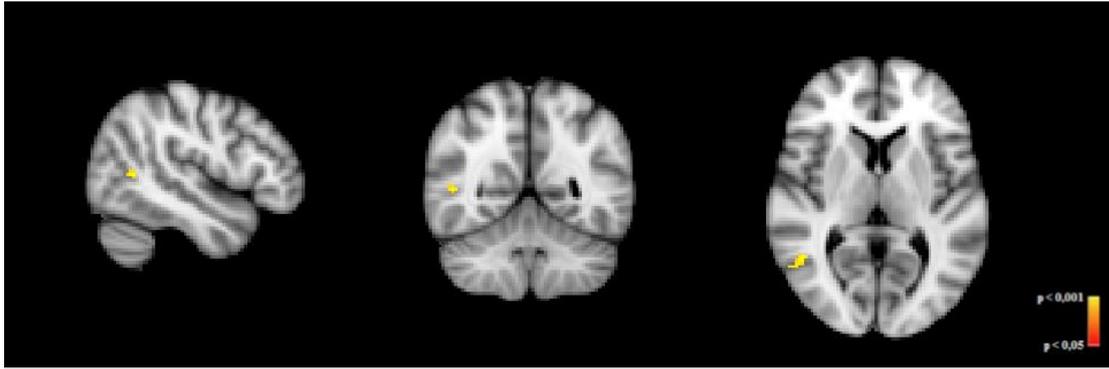


Figura 11 - Alterações na conectividade funcional da DMN na condição pré-NPS no contraste controle > pacientes. A conectividade aumentou no giro temporal médio e no giro temporal superior. Valores de p não corrigidos, $p < 0,001$.

Tabela 8 - Tabela descritiva mostrando as regiões em que a conectividade funcional foi alterada na condição pré-NPS no contraste controle > pacientes.

Cluster 1	
Número de <i>voxels</i> : 21	
Máx. coordenadas: 48, -54, 6	
Região anatômica	% da região nessa localização
Giro temporal médio (D)	80,95
Giro temporal superior (D)	19,05
Substância cinzenta (D)	19,05
Substância branca (D)	80,95
Não identificada	80,95
Área de Brodmann 39 (D)	19,05

máx.: máxima, D: direito, %: porcentagem

Pacientes > Controle

A figura 12 mostra as regiões em que padrão de conectividade se altera, observando-se a existência de apenas um *cluster* ($p < 0,001$ não corrigido). A tabela 9 descreve detalhadamente o resultado obtido.

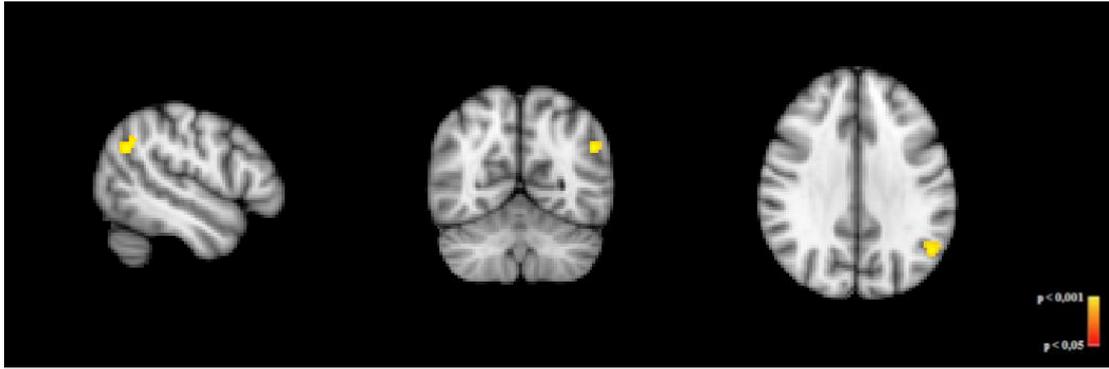


Figura 12 - Alterações na conectividade funcional da DMN na condição pré-NPS no contraste pacientes > controle. A conectividade aumentou no giro temporal médio, no giro temporal superior, no giro angular, no giro supramarginal e no lobo parietal inferior. Valores de p não corrigidos, $p < 0,001$.

Tabela 9 - Tabela descritiva mostrando as regiões em que a conectividade funcional foi alterada na condição pré-NPS no contraste pacientes > controle.

Cluster 1	
Número de <i>voxels</i> : 81	
Máx. coordenadas: -50, -60, 30	
Região anatômica	% da região nessa localização
Giro temporal médio (E)	1,23
Giro temporal superior (E)	9,88
Giro angular (E)	24,69
Giro supramarginal (E)	56,79
Lobo parietal inferior (E)	7,41
Não identificado	1,23
Substância cinzenta (E)	9,88
Substância branca (E)	88,89
Não identificado	90,12
Área de Brodmann 39 (E)	3,70
Área de Brodmann 40 (E)	6,17

máx.: máxima, E: esquerdo, %: porcentagem

NPS

Pacientes > Controle

As figuras 13 e 14 mostram as regiões em que padrão de conectividade se altera, observando-se a existência de dois *clusters* ($p < 0,001$ não corrigido). A tabela 10 descreve detalhadamente o resultado obtido.

Cluster 1

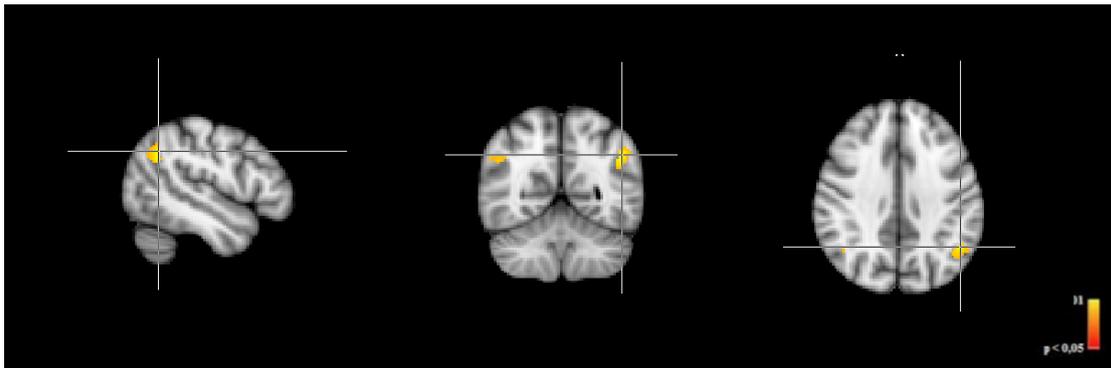


Figura 13 - Alterações na conectividade funcional da DMN na condição NPS no contraste pacientes > controle. O *cluster 1* tem 139 *voxels* e está sinalizado pela cruz. Nele a conectividade aumentou no giro temporal superior, no giro angular, no giro supramarginal e no lobo parietal inferior. Valores de p não corrigidos, $p < 0,001$.

Cluster 2

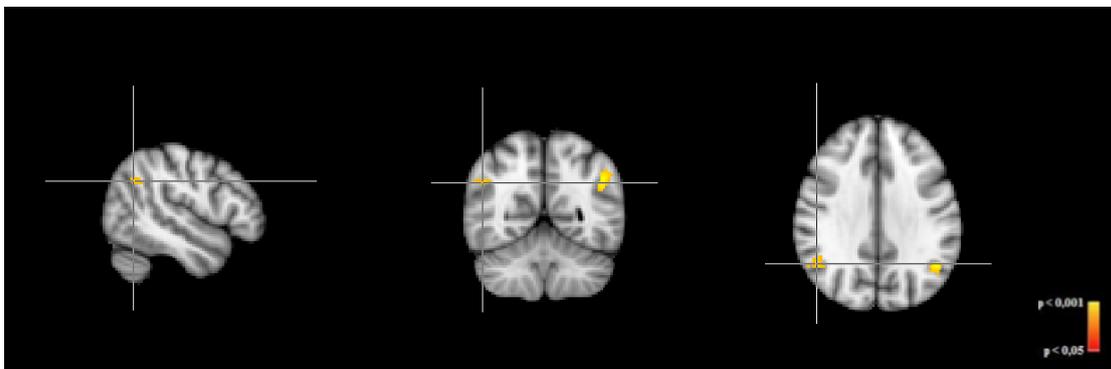


Figura 14 - Alterações na conectividade funcional da DMN na condição NPS no contraste pacientes > controle. O *cluster 2* tem 56 *voxels* e está sinalizado pela cruz. Nele a conectividade aumentou no giro angular, no giro supramarginal e no lobo parietal inferior. Valores de p não corrigidos, $p < 0,001$.

Tabela 10 - Tabela descritiva mostrando as regiões em que a conectividade funcional foi alterada na condição NPS no contraste pacientes > controle.

<i>Cluster 1</i>		<i>Cluster 2</i>	
Número de <i>voxels</i> : 139		Número de <i>voxels</i> : 56	
Máx. coordenadas: -48, -56, 36		Máx. coordenadas: 50, -56, 32	
Região anatômica	% da região nessa localização	Região anatômica	% da região nessa localização
Giro temporal superior (E)	4,32	Giro angular (D)	16,07
Giro angular (E)	33,09	Giro supramarginal (D)	78,57
Giro supramarginal (E)	31,65	Lobo parietal inferior (D)	5,36
Lobo parietal inferior (E)	30,94		
		Substância cinzenta (D)	3,57
Substância cinzenta (E)	5,04	Substância branca (D)	96,43
Substância branca (E)	94,96		
		Não identificado	96,43
Não identificado	94,96	Área de Brodmann 40 (D)	3,57
Área de Brodmann 40 (E)	5,04		

máx.: máxima, D: direito, E: esquerdo, %: porcentagem

Pós-NPS

Pacientes > Controle

As figuras 15 – 18 mostram as regiões em que padrão de conectividade se altera, observando-se a existência de quatro *clusters* ($p < 0,001$ não corrigido). A tabela 11 descreve detalhadamente o resultado obtido.

Cluster 1

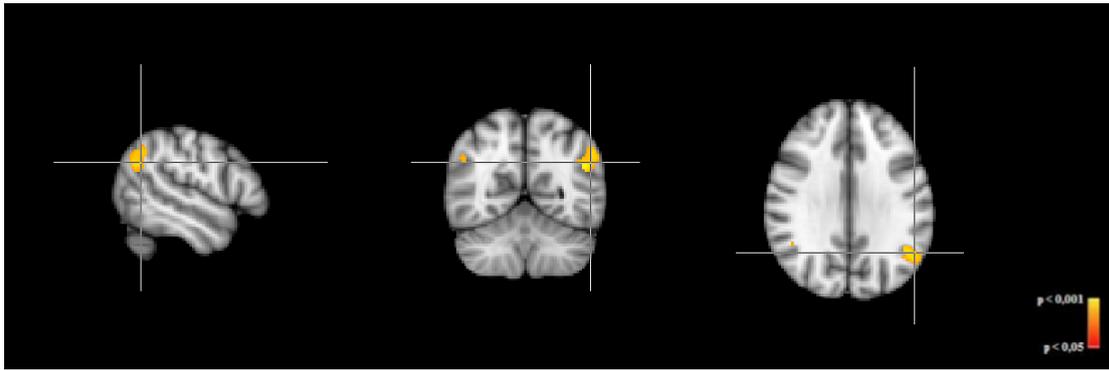


Figura 15 - Alterações na conectividade funcional da DMN na condição pós-NPS no contraste pacientes > controle. O *cluster 1* tem 263 *voxels* e está sinalizado pela cruz. Nele a conectividade aumentou no giro temporal médio, no giro temporal superior, no giro angular, no giro supramarginal e no lobo parietal inferior. Valores de *p* não corrigidos, $p < 0,001$.

Cluster 2

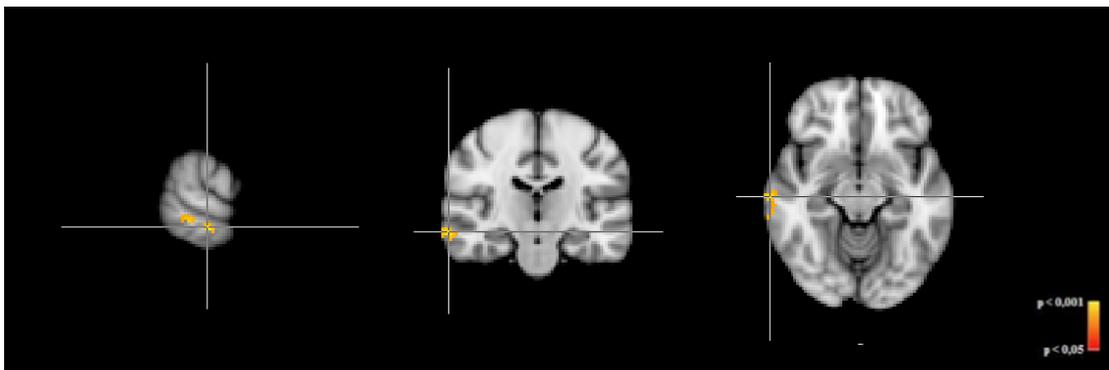


Figura 16 - Alterações na conectividade funcional da DMN na condição pós-NPS no contraste pacientes > controle. O *cluster 2* tem 113 *voxels* e está sinalizado pela cruz. Nele a conectividade aumentou no giro temporal médio direito. Valores de *p* não corrigidos, $p < 0,001$.

Cluster 3

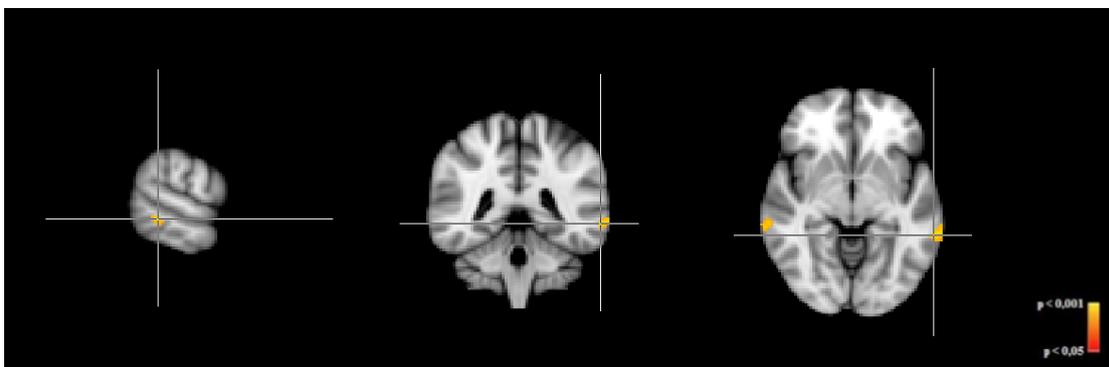


Figura 17 - Alterações na conectividade funcional da DMN na condição pós-NPS no contraste pacientes > controle. O *cluster 3* tem 78 *voxels* e está sinalizado pela cruz. Nele a conectividade aumentou no giro temporal médio esquerdo. Valores de *p* não corrigidos, $p < 0,001$.

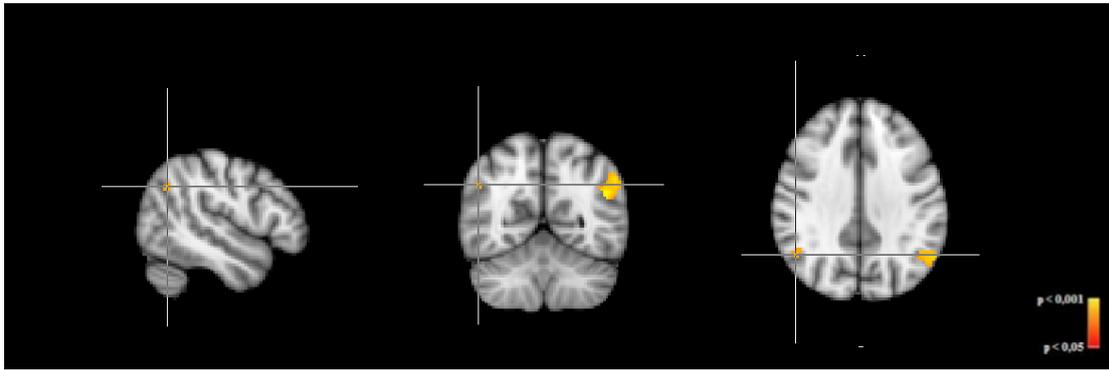
Cluster 4

Figura 18 - Alterações na conectividade funcional da DMN na condição pós-NPS no contraste pacientes > controle. O *cluster 4* tem 31 *voxels* e está sinalizado pela cruz. Nele a conectividade aumentou no giro angular, no giro supramarginal e no lobo parietal inferior. Valores de p não corrigidos, $p < 0,001$.

Tabela 11 - Tabela descritiva mostrando as regiões em que a conectividade funcional foi alterada na condição pós-NPS no contraste pacientes > controle.

<i>Cluster 1</i>		<i>Cluster 2</i>		<i>Cluster 3</i>		<i>Cluster 4</i>	
Número de <i>voxels</i> : 263		Número de <i>voxels</i> : 113		Número de <i>voxels</i> : 78		Número de <i>voxels</i> : 31	
Máx. coordenadas: -48, -58, 28		Máx. coordenadas: 66, -20, -12		Máx. coordenadas: -62, -42, -6		Máx. coordenadas: 50, -58, 34	
Região anatômica	% da região nessa localização	Região anatômica	% da região nessa localização	Região anatômica	% da região nessa localização	Região anatômica	% da região nessa localização
Giro temporal médio (E)	4,94	Não identificado	10,62	Não identificado	7,69	Giro angular (D)	19,35
Giro temporal superior (E)	16,35	Giro temporal médio (D)	89,38	Giro temporal médio (E)	92,31	Giro supramarginal (D)	77,42
Giro angular (E)	22,81					Lobo parietal inferior (D)	3,23
Giro supramarginal (E)	36,88	Não identificado	16,81	Não identificado	20,51		
Lobo parietal inferior (E)	19,01	Substância cinzenta (D)	50,44	Substância cinzenta (E)	46,15	Substância branca (D)	100,00
		Substância branca (D)	32,74	Substância branca (E)	33,33		
Não identificado	3,42					Não identificado	100,00
Substância cinzenta (E)	24,71	Não identificado	49,56	Não identificado	56,41		
Substância branca (E)	71,86	Área de Brodmann 21 (D)	50,44	Área de Brodmann 21 (E)	43,59		
Não identificado	75,29						
Área de Brodmann 39 (E)	10,27						
Área de Brodmann 40 (E)	14,45						

máx.: máxima, D: direito, E: esquerdo, %: porcentagem

A tabela 12 resume os resultados encontrados na comparação entre o grupo de pacientes (sem uso de CLZ + com uso de CLZ) e grupo controle, considerando *clusters* de pelo menos 20 *voxels*.

Tabela 12 - Resultados da comparação entre os grupos pacientes e controle dentro de uma mesma condição. O * marca em que contrastes foram encontrados diferenças significativas considerando valores de $p < 0,001$ não corrigido.

	pré-NPS	NPS	pós-NPS
controle > pacientes	*		
pacientes > controle	*	*	*

NPS: nitroprussiato de sódio

4.2.2.2 Grupo pacientes sem CLZ, grupo pacientes com CLZ e grupo controle

Para a observação das alterações de conectividade funcional em cada condição foram utilizados seis contrastes: controle > paciente sem CLZ, paciente sem CLZ > controle, controle > paciente com CLZ, paciente com CLZ > controle, paciente sem CLZ > paciente com CLZ e paciente com CLZ > paciente sem CLZ. Foram considerados apenas *clusters* com mais de 20 *voxels*.

Pré-NPS:

Na condição pré-NPS foram encontradas diferenças no contraste paciente com CLZ > controle. A figura 19 mostra as regiões em que padrão de conectividade se altera, observando-se aumento na conectividade do giro angular, giro supramarginal e do lobo parietal inferior ($p < 0,001$ não corrigido). A tabela 13 descreve detalhadamente o resultado obtido.

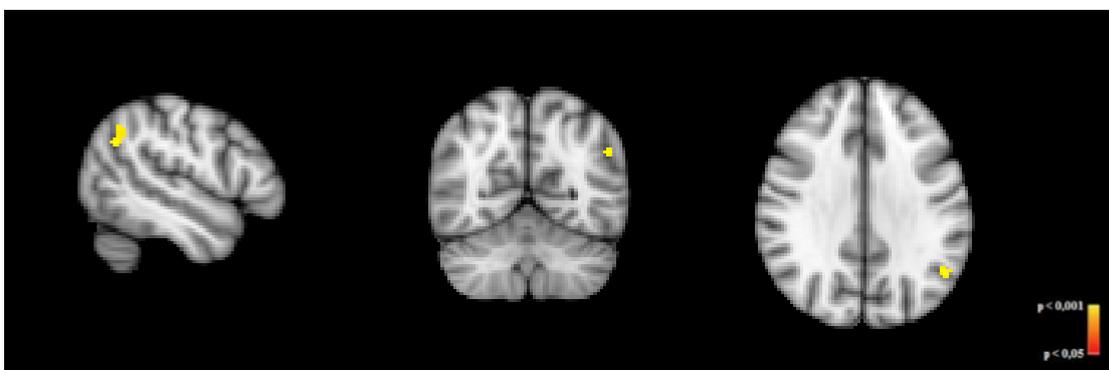


Figura 19 - Alterações na conectividade funcional da DMN na condição pré-NPS no contraste paciente com CLZ > controle. A conectividade aumentou no giro angular, no giro supramarginal e no lobo parietal inferior. Valores de p não corrigidos, $p < 0,001$.

Tabela 13 - Tabela descritiva mostrando as regiões em que a conectividade funcional foi alterada na condição pré-NPS no contraste paciente com CLZ > controle.

Cluster 1	
Número de <i>voxels</i> : 46	
Máx. coordenadas: -50, -60, 32	
Região anatômica	% da região nessa localização
Giro angular (E)	10,87
Giro supramarginal (E)	54,35
Lobo parietal inferior (E)	34,78
Substância cinzenta (E)	6,52
Substância branca (E)	93,48
Não identificado	93,48
Área de Brodmann 40 (E)	6,52

máx.: máxima, E: esquerdo, %: porcentagem.

NPS:

Na condição NPS só foram encontradas diferenças no contraste paciente sem CLZ > controle. As figuras 20, 21, 22 e 23 mostram as regiões em que padrão de conectividade se altera, observando-se a existência de quatro *clusters* ($p < 0,001$ não corrigido). A tabela 14 descreve detalhadamente o resultado obtido para cada um dos *clusters*.

Cluster 1

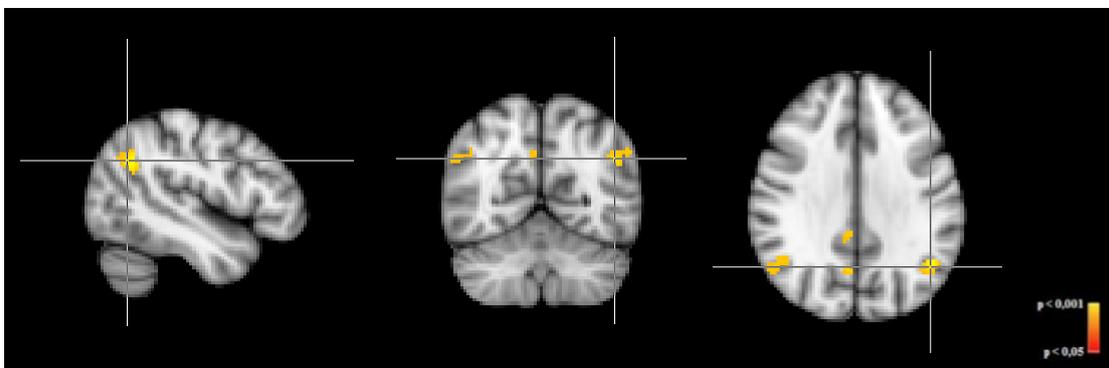


Figura 20 - Alterações na conectividade funcional da DMN na condição NPS no contraste paciente sem CLZ > controle. O *cluster* 1 tem 131 *voxels* e está sinalizado pela cruz. Nele a conectividade aumentou no giro supramarginal, no giro angular, lobo parietal inferior, giro temporal superior e no giro temporal médio. Valores de p não corrigidos, $p < 0,001$.

Cluster 2

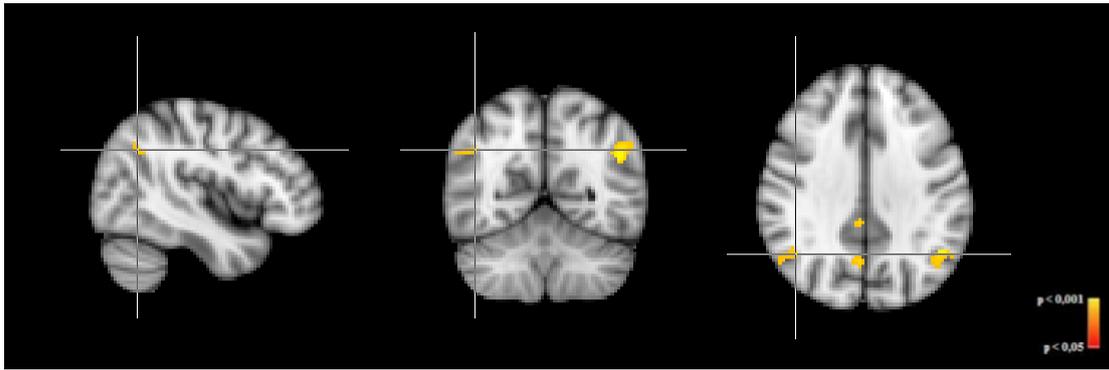


Figura 21 - Alterações na conectividade funcional da DMN na condição NPS no contraste paciente sem CLZ > controle. O *cluster 2* tem 56 *voxels* e está sinalizado pela cruz. Nele a conectividade aumentou no giro supramarginal, no giro angular, lobo parietal inferior e no giro temporal médio. Valores de p não corrigidos, $p < 0,001$.

Cluster 3

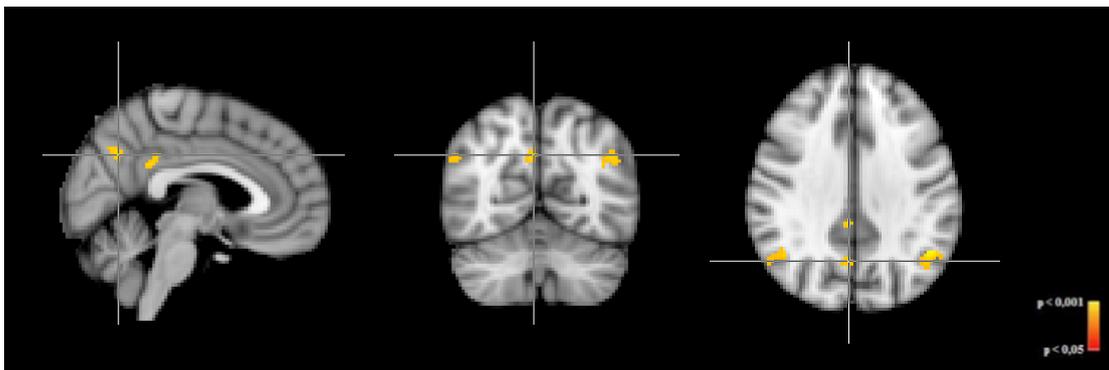


Figura 22 - Alterações na conectividade funcional da DMN na condição NPS no contraste paciente sem CLZ > controle. O *cluster 3* tem 37 *voxels* e está sinalizado pela cruz. Nele a conectividade aumentou no pré-cuneus. Valores de p não corrigidos, $p < 0,001$.

Cluster 4

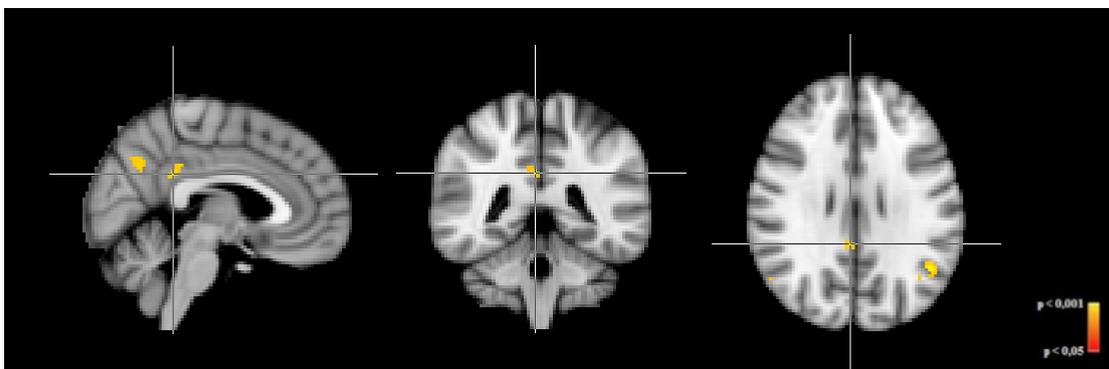


Figura 23 - Alterações na conectividade funcional da DMN na condição NPS no contraste paciente sem CLZ > controle. O *cluster 4* tem 34 *voxels* e está sinalizado pela cruz. Nele a conectividade aumentou no giro cingular. Valores de p não corrigidos, $p < 0,001$.

Tabela 14 - Tabela descritiva mostrando as regiões em que a conectividade funcional foi alterada na condição NPS no contraste paciente sem CLZ > controle.

<i>Cluster 1</i>		<i>Cluster 2</i>		<i>Cluster 3</i>		<i>Cluster 4</i>	
Número de <i>voxels</i> : 131		Número de <i>voxels</i> : 56		Número de <i>voxels</i> : 37		Número de <i>voxels</i> : 34	
Máx. coordenadas: -46, -56, 32		Máx. coordenadas: 44, -58, 34		Máx. coordenadas: 4, -62, 34		Máx. coordenadas: 4, -42, 28	
Região anatômica	% da região nessa localização	Região anatômica	% da região nessa localização	Região anatômica	% da região nessa localização	Região anatômica	% da região nessa localização
Giro temporal médio (E)	3,05	Giro temporal médio (D)	1,79	Pré-cuneus (D)	100,00	Giro cingulado (D)	100,00
Giro temporal superior (E)	7,63	Giro angular (D)	41,07				
Giro angular (E)	39,69	Giro supramarginal (D)	55,36	Não identificado	8,11	Não identificado	14,71
Giro supramarginal (E)	40,46	Lobo parietal inferior (D)	1,79	Substância cinzenta (D)	62,16	Substância cinzenta (D)	41,18
Lobo parietal inferior (E)	9,16			Substância branca (D)	29,73	Substância branca (D)	44,12
		Não identificado	1,79				
Não identificado	1,53	Substância branca (D)	1,79	Não identificado	37,84	Não identificado	58,82
Substância cinzenta (E)	6,11	Substância cinzenta (D)	96,43	Área de Brodmann 7 (D)	62,16	Área de Brodmann 31 (D)	41,18
Substância branca (E)	92,37						
		Não identificado	98,21				
Não identificado	93,89	Área de Brodmann 40 (D)	1,79				
Área de Brodmann 39 (E)	3,05						
Área de Brodmann 40 (E)	3,05						

máx.: máxima, D: direito, E: esquerdo, %: porcentagem.

Pós-NPS:

Na condição pós-NPS foram encontradas diferenças no contraste paciente com CLZ > controle, controle > paciente sem CLZ, paciente sem CLZ > controle.

Paciente com CLZ > controle

A figura 24 mostra as regiões em que padrão de conectividade se altera, observando-se o aumento na conectividade do lobo parietal inferior, giro supramarginal, giro angular, no giro temporal superior e no giro temporal médio ($p < 0,001$ não corrigido). A tabela 15 descreve detalhadamente o resultado obtido.

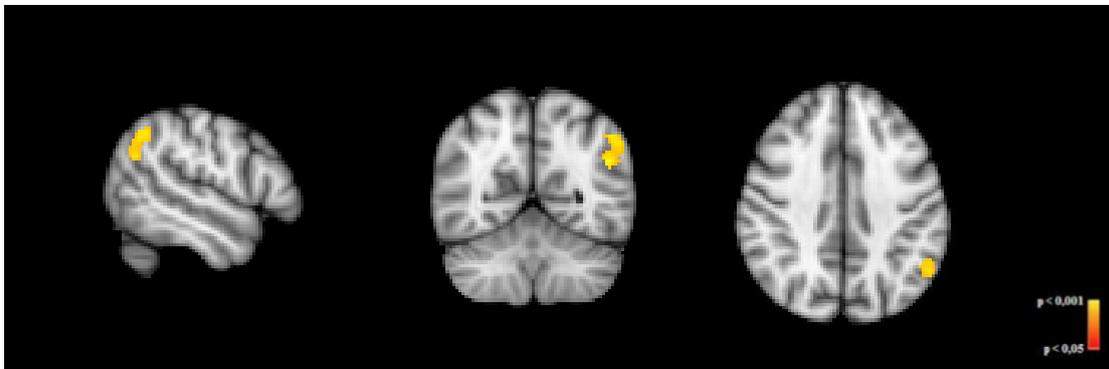


Figura 24 - Alterações na conectividade funcional da DMN na condição pós-NPS no contraste paciente com CLZ > controle. A conectividade aumentou no lobo parietal inferior, giro supramarginal, giro angular, no giro temporal superior e no giro temporal médio. Valores de p não corrigidos, $p < 0,001$.

Tabela 15 (continua) - Tabela descritiva mostrando as regiões em que a conectividade funcional foi alterada na condição pós-NPS no contraste paciente com CLZ > controle.

<i>Cluster 1</i>	
Número de <i>voxels</i> : 218	
Máx. coordenadas: -48, -58, 28	
Região anatômica	% da região nessa localização
Giro temporal médio (E)	1,38
Giro temporal superior (E)	12,84
Giro angular (E)	16,97
Giro supramarginal (E)	28,90
Lobo parietal inferior (E)	39,91

Tabela 15 (conclusão) - Tabela descritiva mostrando as regiões em que a conectividade funcional foi alterada na condição pós-NPS no contraste paciente com CLZ > controle.

Cluster 1	
Número de <i>voxels</i> : 218	
Máx. coordenadas: -48, -58, 28	
Região anatômica	% da região nessa localização
Não identificado	1,38
Substância cinzenta (E)	25,23
Substância branca (E)	73,39
Não identificado	74,77
Área de Brodmann 39 (E)	4,13
Área de Brodmann 40 (E)	21,10

máx.: máxima, E: esquerdo, %: porcentagem.

Controle > Paciente sem CLZ

A figura 25 mostra as regiões em que padrão de conectividade se altera, observando-se o aumento na conectividade do giro pós-central ($p < 0,001$ não corrigido). A tabela 16 descreve detalhadamente o resultado obtido.

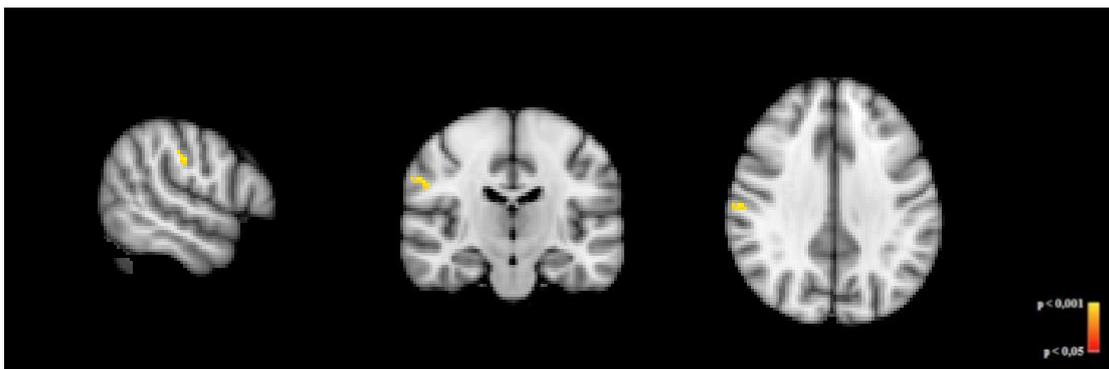


Figura 25 - Alterações na conectividade funcional da DMN na condição pós-NPS no contraste controle > paciente sem CLZ. A conectividade aumentou no giro pós-central. Valores de p não corrigidos, $p < 0,001$.

Tabela 16 - Tabela descritiva mostrando as regiões em que a conectividade funcional foi alterada na condição pós-NPS no contraste controle > paciente sem CLZ.

Cluster 1	
Número de <i>voxels</i> : 24	
Máx. coordenadas: 62, -20, 36	
Região anatômica	% da região nessa localização
Giro pós-central (D)	100,00
Substância cinzenta (D)	45,83
Substância branca (D)	54,17
Não identificado	54,17
Área de Brodmann 2 (D)	4,17
Área de Brodmann 3 (D)	41,67

máx.: máxima, D: direito, %: porcentagem.

Paciente sem CLZ > Controle

As figuras 26, 27, 28, 29, 30 e 31 mostram as regiões em que padrão de conectividade se altera, observando-se a existência de seis *clusters* ($p < 0,001$ não corrigido). A tabela 17 descreve detalhadamente o resultado obtido para cada um dos clusters.

Cluster 1

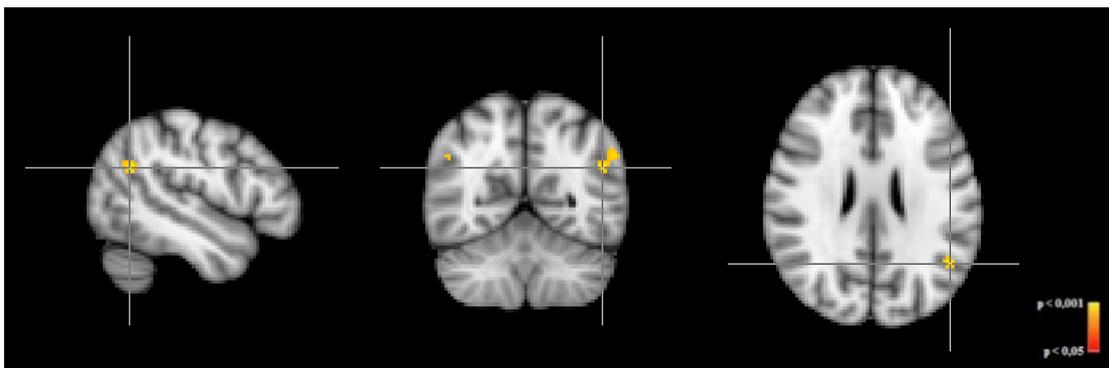


Figura 26 - Alterações na conectividade funcional da DMN na condição pós-NPS no contraste paciente sem CLZ > controle. O *cluster* 1 tem 85 *voxels* e está sinalizado pela cruz. Nele a conectividade aumentou no giro supramarginal, giro angular, giro temporal superior, giro temporal médio e no lobo parietal inferior. Valores de p não corrigidos, $p < 0,001$.

Cluster 2

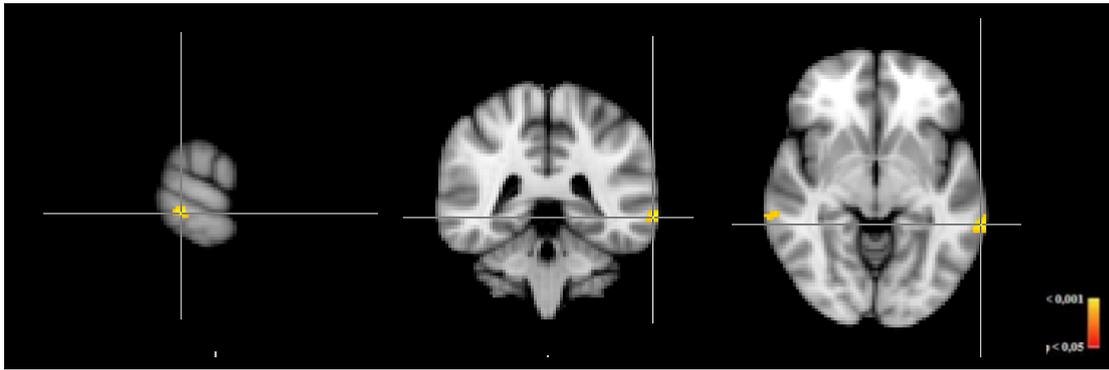


Figura 27 - Alterações na conectividade funcional da DMN na condição pós-NPS no contraste paciente sem CLZ > controle. O *cluster 2* tem 48 *voxels* e está sinalizado pela cruz. Nele a conectividade aumentou no giro temporal. Valores de *p* não corrigidos, $p < 0,001$.

Cluster 3

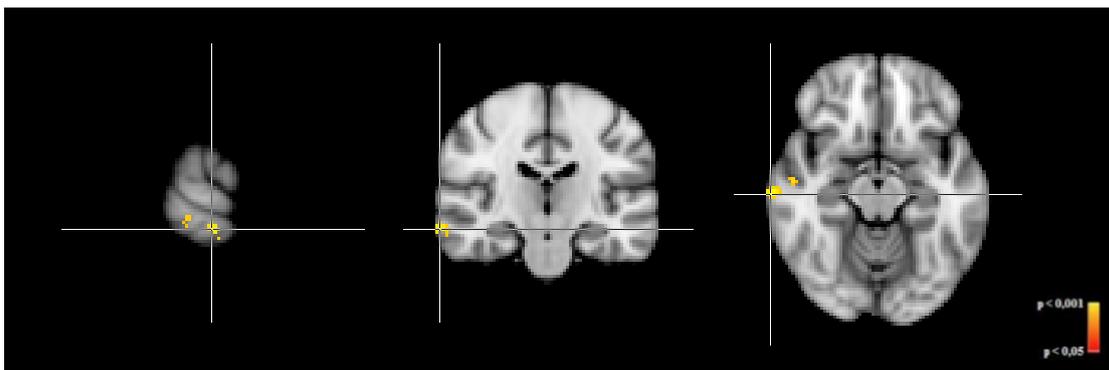


Figura 28 - Alterações na conectividade funcional da DMN na condição pós-NPS no contraste paciente sem CLZ > controle. O *cluster 3* tem 41 *voxels* e está sinalizado pela cruz. Nele a conectividade aumentou no giro temporal médio, giro temporal inferior e outras regiões. Valores de *p* não corrigidos, $p < 0,001$.

Cluster 4

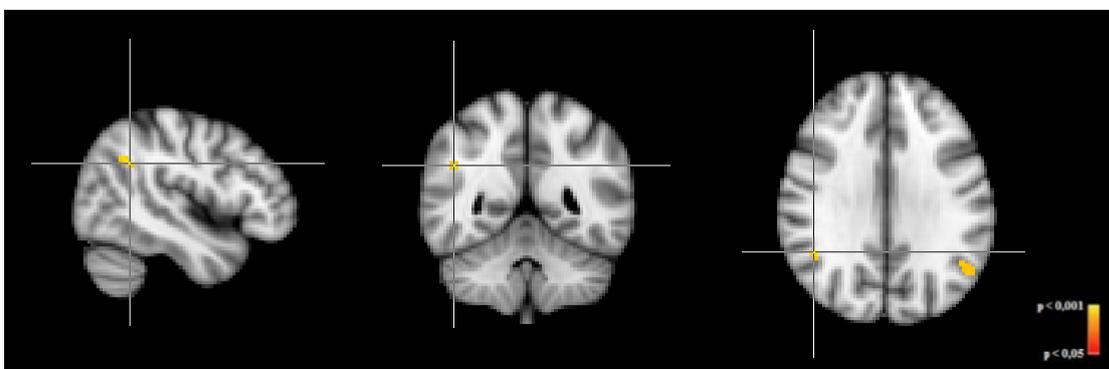


Figura 29 - Alterações na conectividade funcional da DMN na condição pós-NPS no contraste paciente sem CLZ > controle. O *cluster 4* tem 37 *voxels* e está sinalizado pela cruz. Nele a conectividade aumentou no giro supramarginal, giro angular e no lobo parietal inferior. Valores de *p* não corrigidos, $p < 0,001$.

Cluster 5

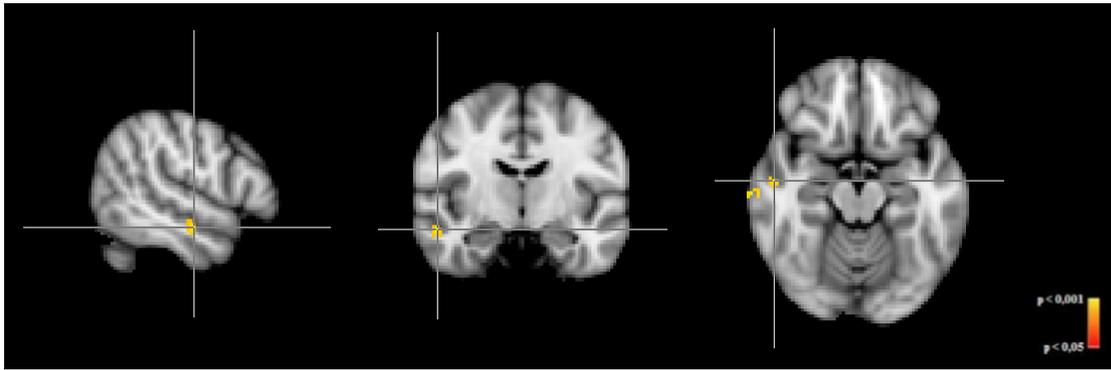


Figura 30 - Alterações na conectividade funcional da DMN na condição pós-NPS no contraste paciente sem CLZ > controle. O *cluster 5* tem 29 *voxels* e está sinalizado pela cruz. Nele a conectividade aumentou no giro temporal médio e no subgiral. Valores de p não corrigidos, $p < 0,001$.

Cluster 6

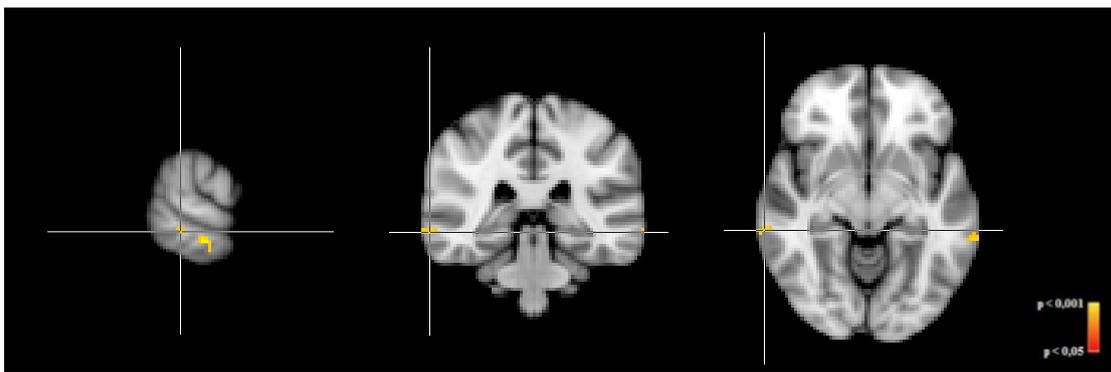


Figura 31 - Alterações na conectividade funcional da DMN na condição pós-NPS no contraste paciente sem CLZ > controle. O *cluster 6* tem 21 *voxels* e está sinalizado pela cruz. Nele a conectividade aumentou no giro temporal médio e outras regiões. Valores de p não corrigidos, $p < 0,001$.

Tabela 17 (continua) - Tabela descritiva mostrando as regiões em que a conectividade funcional foi alterada na condição pós-NPS no contraste paciente sem CLZ > controle.

<i>Cluster 1</i>		<i>Cluster 2</i>		<i>Cluster 3</i>	
Número de <i>voxels</i> : 85		Número de <i>voxels</i> : 48		Número de <i>voxels</i> : 41	
Máx. coordenadas: -48, -58, 26		Máx. coordenadas: -66, -40, -6		Máx. coordenadas: 68, -20, -14	
Região anatômica	% da região nessa localização	Região anatômica	% da região nessa localização	Região anatômica	% da região nessa localização
Giro temporal médio (E)	4,71	Não identificado	8,33	Não identificado	29,27
Giro temporal superior (E)	22,35	Giro temporal médio (E)	91,67	Giro temporal inferior (D)	7,32
Giro angular (E)	11,76			Giro temporal médio (D)	63,41
Giro supramarginal (E)	57,65	Não identificado	22,92		
Lobo parietal inferior (E)	3,53	Substância cinzenta (E)	50,00	Não identificado	34,15
		Substância branca (E)	27,08	Substância cinzenta (D)	56,10
Não identificado	3,53			Substância branca (D)	9,76
Substância cinzenta (E)	15,29	Não identificado	52,08		
Substância branca (E)	81,18	Área de Brodmann 21 (E)	47,92	Não identificado	43,90
				Área de Brodmann 20 (D)	4,88
Não identificado	84,71			Área de Brodmann 21 (D)	51,22
Área de Brodmann 39 (E)	5,88				
Área de Brodmann 40 (E)	9,41				

Tabela 17 (conclusão) - Tabela descritiva mostrando as regiões em que a conectividade funcional foi alterada na condição pós-NPS no contraste paciente sem CLZ > controle.

Cluster 4		Cluster 5		Cluster 6	
Número de <i>voxels</i> : 37		Número de <i>voxels</i> : 29		Número de <i>voxels</i> : 21	
Máx. coordenadas: 46, -50, 30		Máx. coordenadas: 54, -10, -16		Máx. coordenadas: 64, -34, -8	
Região anatômica	% da região nessa localização	Região anatômica	% da região nessa localização	Região anatômica	% da região nessa localização
Giro angular (D)	10,81	Subgiral (D)	13,79	Não identificado	9,52
Giro supramarginal (D)	86,49	Giro temporal médio (D)	86,21	Giro temporal médio (D)	90,48
Lobo parietal inferior (D)	2,70	Não identificado	17,24	Não identificado	23,81
Substância branca (D)	100,00	Substância cinzenta (D)	13,79	Substância cinzenta (D)	38,10
		Substância branca (D)	68,97	Substância branca (D)	38,10
Nao identificado	100,00	Não identificado	86,21	Não identificado	61,90
		Área de Brodmann 21 (D)	13,79	Área de Brodmann 21 (D)	38,10

máx.: máxima, D: direito, E: esquerdo, %: porcentagem.

A tabela 18 resume os resultados encontrados na comparação dentro de uma mesma condição (pré-NPS, NPS e pós-NPS) entre os grupos sem CLZ, com CLZ e controle.

Tabela 18 - Resultados da comparação entre grupos dentro de uma mesma condição. O * marca em que contrastes foram encontrados diferenças significativas considerando valores de $p < 0,001$ não corrigido.

	pré-NPS	NPS	pós-NPS
controle > paciente sem CLZ			*
paciente sem CLZ > controle		*	*
controle > paciente com CLZ			
paciente com CLZ > controle	*		*
paciente sem CLZ > paciente com CLZ			
paciente com CLZ > paciente sem CLZ			

CLZ: clozapina, NPS: nitroprussiato de sódio.

4.2.3 Tarefa de escuta passiva

Para a observação das alterações da ativação da máscara do córtex auditivo entre as condições no grupo controle com tarefa, foram utilizados seis contrastes: pré-NPS > NPS, NPS > pré-NPS, NPS > pós-NPS, pós-NPS > NPS, pré-NPS > pós-NPS e pós-NPS > pré-NPS. Foram considerados apenas *clusters* com mais de 20 *voxels*.

Não foram encontradas regiões estatisticamente significativas em nenhum dos contrastes. A figura 32 mostra o valor médio dos mapas estatísticos da região definida pela máscara do córtex auditivo em cada uma das condições (pré-NPS, NPS e pós-NPS), ilustrando que não existem diferenças entre as 3 condições comparadas.

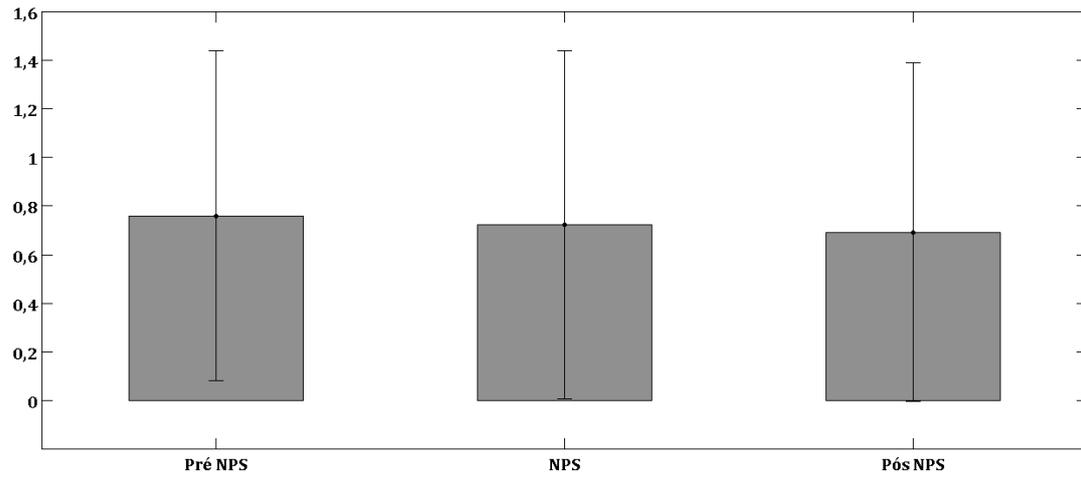


Figura 32 - Valores médios dos mapas estatísticos na região definida pela máscara do córtex auditivo em cada uma das condições (pré-NPS, NPS e pós-NPS). As barras representam o desvio padrão.

DISCUSSÃO

5. Discussão

O presente estudo objetivou-se a investigar o efeito do NPS, medicação cujos efeitos terapêuticos já foram descritos na sintomatologia da esquizofrenia, na conectividade da DMN de pacientes portadores desse transtorno mental e controles saudáveis. Através da RMf, observamos o padrão de conectividade dessa rede neural antes, durante e após a infusão da droga em estudo. Na fase pré-NPS encontramos uma possível associação entre um estado de hiperconectividade da DMN e uma maior gravidade do quadro psicopatológico. Já em relação ao efeito do NPS, nossos resultados mostraram um aumento da conectividade funcional da DMN com a infusão da medicação nos pacientes portadores de esquizofrenia, especialmente no hemisfério D, enquanto esse mesmo padrão não foi encontrado nos controles saudáveis. O aumento na conectividade das regiões pertencentes à rede neural também se mostrou distinto entres os grupos de pacientes avaliados, sendo mais precoce e amplo nos pacientes que não estavam em uso de CLZ.

5.1 Pré- NPS

Partindo-se da condição pré-NPS, ao compararmos a conectividade da DMN no grupo de pacientes portadores de esquizofrenia em relação ao grupo controle, ambos os grupos apresentaram regiões da DMN com maior conectividade. Os pacientes tiveram maior conectividade nas regiões do giro temporal médio E, giro temporal superior E, giro angular E, giro supramarginal E e lobo parietal inferior E, enquanto o grupo controle teve maior conectividade no giro temporal médio D e giro temporal superior D. Porém, ao separarmos os pacientes nos dois grupos de acordo com a medicação em uso, o grupo em uso de CLZ apresentou um padrão diferenciado de maior conectividade da DMN em relação aos controles na fase anterior à infusão de NPS, enquanto isso não foi observado no grupo de pacientes sem uso de CLZ. Assim, a maior conectividade das regiões da DMN encontrada no grupo formado por todos os pacientes portadores de esquizofrenia pode ser atribuída, principalmente, ao padrão de hiperconectividade encontrado no grupo em uso de CLZ.

É crescente o número de estudos que investigam as alterações na conectividade da DMN na esquizofrenia, entretanto, os resultados encontrados têm se mostrado bastante heterogêneos. Diversos estudos apontam para a presença de uma maior conectividade funcional da DMN durante *resting state* (Zhou *et al.*, 2007; Whitfield-Gabrieli *et al.*, 2009;

Mannell *et al.*, 2010; Skudlarski *et al.*, 2010; Woodward, Rogers e Heckers, 2011; Mingoia *et al.*, 2012; Tang *et al.*, 2013; Chang *et al.*, 2014; Alonso-Solis *et al.*, 2015; Kindler *et al.*, 2015). Entretanto, outra parcela aponta para uma menor conectividade desta rede neural nos portadores da doença (Bluhm *et al.*, 2007; Rotarska-Jagiela *et al.*, 2010; Camchong *et al.*, 2011; Alonso-Solis *et al.*, 2012; Liemburg *et al.*, 2012; He *et al.*, 2013; Kasperek *et al.*, 2013; Khadka *et al.*, 2013; Manoliu, Riedl, Doll, *et al.*, 2013; Orliac *et al.*, 2013; Meda *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014). É possível verificar diferenças metodológicas importantes entre esses estudos no que se refere à amostra de pacientes selecionados, tipo e duração do tratamento medicamentoso vigente e, principalmente, a respeito da técnica de análise das imagens funcionais empregada. As duas técnicas mais comumente empregadas para o processamento das imagens funcionais são a análise baseada na *seed*/ROI e a análise do componente independente (ACI).

A análise baseada na *seed*/ROI extrai o curso temporal do sinal BOLD de uma região selecionada (*seed*/ROI) e determina a correlação temporal entre esse sinal extraído e o curso temporal do sinal BOLD de todos os outros *voxels* cerebrais (Uddin *et al.*, 2009). Por sua vez, a ACI é um método que decompõe estatisticamente as séries temporais da RMf em um conjunto de componentes maximamente independentes (temporalmente ou espacialmente) a partir do sinal BOLD (Mckeown *et al.*, 1997; Calhoun *et al.*, 2001). Ao contrário do anterior, este método não parte de uma região pré-selecionada e consegue localizar e caracterizar redes funcionais a partir de uma varredura de todos os dados coletados. (Jafri *et al.*, 2008).

Através de uma análise crítica da literatura disponível sobre o tema, aferimos que nos últimos anos é crescente o número de estudos que utilizam a ACI em relação aos que utilizam a análise baseada na *seed*/ROI para processamento das imagens funcionais. Ao analisarmos os resultados desses estudos que empregam a ACI, observamos uma maior parcela deles apontando para uma menor conectividade da DMN na esquizofrenia em relação aos controles saudáveis. Já por sua vez, analisando os estudos que empregam a análise baseada na *seed*/ROI, encontramos mais estudos com resultados de uma maior conectividade desta rede neural na doença.

O presente estudo empregou a técnica de análise baseada na *seed*/ROI e na mesma direção que a literatura atual, também encontrou uma maior conectividade da DMN na esquizofrenia em relação aos controles saudáveis, entretanto, isso só foi observado no grupo de pacientes em uso de CLZ. Como já é bem conhecido, o uso do antipsicótico CLZ é indicado para os pacientes portadores de esquizofrenia refratária. Diante disso, esses pacientes

em uso de CLZ apresentam um curso mais grave e refratário da doença, justamente por não terem apresentado uma resposta terapêutica adequada aos outros antipsicóticos disponíveis (Buchanan, 1995; Wahlbeck *et al.*, 1999; Kane e Correll, 2010). Essa característica de maior gravidade psicopatológica se refletiu nos valores médios da pontuação da BPRS entre os grupos de pacientes portadores de esquizofrenia do nosso estudo. O grupo em uso de CLZ obteve pontuações significativamente mais altas, já que sabidamente apresentam um curso mais grave e refratário da doença.

Novamente, na mesma direção que apontou os resultados do nosso estudo na fase pré-NPS de uma maior conectividade em regiões desta rede neural nos pacientes com sintomatologia mais grave, recentes estudos também encontraram associação entre a conectividade da DMN e a severidade dos sintomas psicopatológicos nos pacientes esquizofrênicos. Um estudo que comparou pacientes portadores de esquizofrenia refratários ao tratamento farmacológico, pacientes não refratários e controles saudáveis, observou uma maior conectividade das regiões do córtex pré-frontal dorso-medial e polo temporal nos pacientes com pior sintomatologia (Alonso-Solis *et al.*, 2015). Kindler *et al.* também estudando uma amostra de pacientes refratários, encontrou a conectividade funcional do pré-cuneus correlacionada positivamente às características psicopatológicas avaliadas através do escore total da escala de síndrome positiva e negativa (PANSS) (Kindler *et al.*, 2015). Outros estudos apontaram uma correlação positiva entre a hiperconectividade em repouso de regiões pertencentes à rede neural, como o córtex pré-frontal medial e entre córtex do cíngulo posterior e giro frontal médio E, e os escores das escalas positiva e geral da PANSS, respectivamente (Whitfield-Gabrieli *et al.*, 2009; Woodward, Rogers e Heckers, 2011). E por fim, um pior *insight* entre os pacientes portadores de esquizofrenia também foi associado a hiperconectividade das regiões do giro angular e córtex do cíngulo posterior da DMN (Gerretsen *et al.*, 2014).

Outro ponto que vem ao encontro da hipótese de maior conectividade da DMN nos quadros de sintomatologia mais grave e/ou refratariedade, é a observação dos resultados de estudos envolvendo amostras de pacientes iniciando o curso da doença. Um estudo que avaliou pacientes em primeiro episódio psicótico, com sintomas positivos e negativos há menos de um ano, encontrou uma menor conectividade funcional entre as regiões da DMN, córtex pré-frontal dorso-medial e o córtex do cíngulo posterior/pré-cuneus, nos pacientes em relação aos controles saudáveis (Alonso-Solis *et al.*, 2012). Um outro estudo investigou uma amostra de 115 pacientes em primeiro episódio psicótico e virgens de tratamento

medicamentoso, tendo sido confirmado o diagnóstico de esquizofrenia em todos os voluntários ao longo do seguimento longitudinal. Esse estudo também apontou para um estado de menor conectividade em regiões da DMN (He *et al.*, 2013). Assim, todo esse panorama nos permite pensar que a hiperconectividade da DMN pode ter uma papel importante em relação à gravidade da sintomatologia clínica e cognitiva ao longo do curso da esquizofrenia.

A respeito das regiões que apresentaram maior conectividade nos pacientes em uso de CLZ em relação aos controles na fase pré-NPS, temos o giro angular E, o giro supramarginal E e o lobo parietal inferior E. Essas regiões têm grande relação com uma das áreas cerebrais responsáveis pela mentalização, o sulco temporal superior posterior, que engloba a junção temporo-parietal e se estende até o giro angular (Frith e Frith, 2003). O processo de mentalização, também conhecido como teoria da mente, refere-se à capacidade cognitiva do indivíduo de inferir o seu próprio estado mental e o estado mental de outras pessoas e, desta forma, interpretar, explicar e prever os comportamentos (Frith, Morton e Leslie, 1991; Scholl e Leslie, 1999). Esse processo é relacionado como sendo automático e não exigindo uma decisão deliberada para ocorrer (Scholl e Leslie, 1999; Kampe, Frith e Frith, 2003).

No contexto do estudo da teoria da mente nos transtornos psiquiátricos, levantou-se o questionamento a respeito da possibilidade dos sintomas psicóticos da esquizofrenia poderem ser explicados por uma má interpretação cognitiva das próprias intenções e das intenções de outras pessoas, resultando assim, de uma alteração do processo de mentalização. Alguns pacientes com esquizofrenia, por exemplo, ao invés de tomar suas crenças como representações subjetivas da realidade, igualam suas representações com a realidade. Isso pode causar uma dificuldade em distinguir entre a subjetividade e a objetividade e assim, gerar falsas crenças na forma de convicções delirantes. Uma negligência dos sinais sociais e intenções de outras pessoas também pode levar a uma ruptura da comunicação e, eventualmente, uma desordem formal do pensamento. Além disso, os pacientes esquizofrênicos que têm dificuldade em reconhecer seus comportamentos como resultado de suas próprias intenções, podem interpretar suas ações como estando sob um controle externo (Frith; Brune, 2005).

Neste contexto, a hiperconectividade dessas regiões da DMN nos pacientes em uso de CLZ, ou seja, com sintomatologia mais grave, pode estar relacionada ao uso de estratégias neuronais distintas nessas áreas cerebrais, com a presença de conectividades ou cooperações excepcionais, e isso levando a um processo de hipermentalização na esquizofrenia (Zhou *et*

al., 2007). Esse processo implicaria em uma alteração no limite da normalidade entre os pensamentos internos e as percepções externas, podendo assim, gerar o quadro psicopatológico conhecido desse transtorno mental (Whitfield-Gabrieli *et al.*, 2009).

Ainda em relação às regiões da DMN que se apresentaram com maior conectividade tanto no grupo de pacientes como no subgrupo em uso de CLZ em relação aos controles, observamos uma lateralização na qual todas as regiões hiperconectadas encontravam-se à E. Por sua vez, quando avaliamos o grupo de voluntários saudáveis, observamos uma lateralização oposta, com as regiões do giro temporal médio e giro temporal superior hiperconectadas à D. Neste contexto, um corpo crescente de evidências tem revelado que a assimetria entre hemisféricos na esquizofrenia não é apenas estrutural mas também funcional, existindo um assimetria anormal nas conexões funcionais quando comparamos portadores deste transtorno com sujeitos saudáveis (Ribolsi *et al.*, 2014). Um estudo que também utilizou a RMf em *resting state* revelou que um grupo de pacientes portadores de esquizofrenia com sintomatologia positiva predominante apresentava maior assimetria entre os hemisférios à E quando comparados ao outro grupo de pacientes com predomínio de sintomas negativos e controles. Em contraste, os pacientes portadores de maior sintomatologia negativa apresentavam maior assimetria à D em relação aos outros grupos. O mesmo estudo observou algumas regiões pertencentes à DMN exibindo uma assimetria anormal na conectividade funcional nos pacientes esquizofrênicos, independente da sintomatologia dominante (Ke *et al.*, 2010). Na mesma direção, também encontramos alterações na conectividade da DMN na esquizofrenia e dentro elas, a presença de uma assimetria anormal entre o funcionamento dos hemisférios já relatada na literatura científica e fonte de maiores estudos.

Por fim, uma outra possibilidade importante a ser aventada a respeito do padrão distinto de conectividade da DMN entre os grupos de pacientes divididos de acordo com a medicação antipsicótica em uso, é de um efeito diferenciado da CLZ na conectividade da DMN em relação aos demais antipsicóticos. Em uma revisão sistemática da literatura realizada pelo nosso grupo de pesquisa na qual se investigou as alterações estruturais e funcionais associadas ao uso da medicação CLZ na esquizofrenia, encontramos um padrão diferenciado de ação no sistema nervoso central dessa droga em relação aos antipsicóticos típicos e também outros atípicos. Esse padrão funcional distinto nos pacientes em uso de CLZ foi observado principalmente em lobo frontal, especialmente áreas pré-frontais e gânglios da base, sendo uma menor ativação encontrada. Porém, alguns estudos também apontaram uma

maior ativação de áreas corticais, como o lobo parietal, com o uso da CLZ (Garcia *et al.*, 2015).

Quando comparada aos outros antipsicóticos, além do antagonismo mais fraco aos receptores dopaminérgicos D₂, a CLZ apresenta um amplo espectro de atividade colinérgica, adrenérgica e serotoninérgica, que pode ser responsável pelo seu perfil único de eficácia (Wenthur e Lindsley, 2013). A preferência pelo antagonismo aos receptores D₁ ou D₄, ao invés de D₂, também pode ser essencial, assim como sua alta afinidade pelo receptor serotoninérgico 5-HT_{2A} (Seeman, Corbett e Van Tol, 1997; Meltzer, 1999). A CLZ também tem efeitos significativos e diferenciados nos circuitos GABAérgicos e glutamatérgicos e está, principalmente, associada a uma melhora da transmissão glutamatérgica, já visto que em estudos animais essa droga causou aumento na atividade dos receptores glutamatérgicos NMDA (Arvanov *et al.*, 1997; Meltzer, 1997; Naheed e Green, 2001; Melone, Bragina e Conti, 2003; Bishara e Taylor, 2008; Fakra e Azorin, 2012). Assim, o conjunto de todas essas características farmacológicas distintas atribuídas à CLZ pode também estar relacionada a maior conectividade de regiões da DMN encontrada apenas no grupo de pacientes em uso desse antipsicótico.

5.2. Efeito do NPS

Em relação ao efeito da administração de NPS, ao compararmos a conectividade funcional da DMN no grupo de pacientes portadores de esquizofrenia em relação aos controles, observamos um efeito de aumento da conectividade em regiões à D dessa rede neural. Como já discutido anteriormente, regiões pertencentes à DMN já se encontravam hiperconectadas no hemisfério E na fase pré-NPS e, com a infusão da droga, esse padrão de conectividade se ampliou para regiões localizadas no hemisfério contralateral. Esse padrão de aumento de conectividade de regiões à D também pode ser observado quando comparamos a conectividade da DMN entre as fases pré-NPS, NPS e pós-NPS dentro de cada grupo de pacientes. A partir desses resultados, é de extrema relevância destacar um efeito de modulação à D associado ao NPS, nos direcionando à hipótese do efeito da droga estar relacionado à uma ampliação da conectividade da DMN nos portadores de esquizofrenia.

Pensando-se na assimetria funcional entre os hemisférios e no efeito do NPS sobre ela, nos remetemos a uma das funções cerebrais sabidamente lateralizada, a linguagem. A disfunção da linguagem na esquizofrenia tem sido um alvo importante de estudos uma vez

que, muitos dos sintomas chaves da doença são expressos através da linguagem e a própria alteração dessa função mental, também faz parte da sintomatologia do transtorno (Tandon *et al.*, 2013). Uma das hipóteses levantadas diz respeito aos indivíduos portadores de esquizofrenia possuírem uma anormalidade na lateralização da linguagem, apresentando desta forma, uma falha em estabelecer o hemisfério E como dominante e essa falha contribuiria para o aparecimento dos sintomas (Crow, Timothy J., 2004; Crow, T. J., 2004). Nesse contexto, evidências estruturais e funcionais sugerem que a esquizofrenia está associada com uma redução da lateralização da linguagem para o hemisfério E, com alguns estudos apontando até uma lateralização reversa para o hemisfério D (Gruzelier, 1999; Kwon *et al.*, 1999; Kircher *et al.*, 2002; Ribolsi *et al.*, 2014). Desta forma, o envolvimento do hemisfério D na mediação das funções de linguagem do hemisfério E parece ser maior nos pacientes esquizofrênicos (Mitchell e Crow, 2005).

Em contraste com o hemisfério E que está relacionado predominantemente a processos linguísticos tais como fonologia, morfologia e sintaxe, o hemisfério D atua como o principal mediador de fenômenos paralinguísticos e pragmáticos que acompanham as palavras e podem influenciar ou modificar o significado das mesmas. As funções desses fenômenos são cruciais para a compreensão da real intenção comunicativa de uma outra pessoa e para uma comunicação social efetiva. Quando prejudicadas, podem contribuir para um déficit na interação social como o encontrado entre os sintomas da esquizofrenia. O hemisfério D também está implicado em outras funções que se encontram prejudicadas na esquizofrenia, como a compreensão e produção de discurso, o processamento de significados alternativos (metáforas) e a compreensão e produção da prosódia emocional (Mitchell e Crow, 2005).

Frente à importância das funções exercidas pelo hemisfério D e ao prejuízo das mesmas comumente observado no quadro psicopatológico dos portadores de esquizofrenia, podemos aventar que esse amplo efeito do NPS ocorreu na direção de restabelecer o funcionamento de áreas implicadas nesses processos afetados pela doença. Esses resultados nos auxiliam a fundamentar os efeitos terapêuticos da droga já descritos em um estudo prévio do nosso grupo de pesquisa, os quais nos motivaram a realizar o presente estudo. Após a administração aguda endovenosa contínua em baixas doses de NPS (0,5 µg/kg/minuto durante quatro horas) em pacientes portadores de esquizofrenia obteve-se uma melhora segura, rápida e duradoura de sintomas positivos, negativos, ansiosos e depressivos após uma única aplicação da droga (Hallak *et al.*, 2013). Sintomas cognitivos também foram avaliados uma hora antes da infusão e oito horas após a mesma, resultando em uma melhora

significativa da performance cognitiva desses pacientes após a infusão da droga (Maia-De-Oliveira, Abrao, *et al.*, 2015).

Em um segundo momento, quando dividimos os pacientes em dois grupos, sem uso de CLZ e com uso de CLZ, e analisamos o efeito do NPS dentro de cada grupo e também entre eles e o grupo de controles saudáveis, encontramos um efeito significativo de aumento da conectividade em ambos os subgrupos de pacientes. O grupo sem CLZ apresentou um aumento da conectividade mais precoce, já durante a fase de infusão da droga, sendo também mais amplo e simétrico entre os hemisférios. Por sua vez, o grupo com CLZ apresentou um aumento de conectividade mais tardio e restrito, apenas na fase pós-NPS.

Partindo-se desses efeitos distintos entre os grupos de pacientes, é possível pensar que a gravidade do quadro psicopatológico da esquizofrenia possa diferenciar a ação do NPS. O efeito mais importante, sendo esse precoce e envolvendo um maior número de regiões da DMN distribuídas homogeneamente nos hemisférios D e E, ocorreu nos pacientes não portadores de esquizofrenia refratária. Já o efeito mais tardio e menos extenso ocorreu nos pacientes refratários. Como já descrito em alguns estudos disponíveis na literatura e também observado em nossos resultados da fase pré-NPS, o padrão de conectividade da DMN na esquizofrenia pode ser distinto entre os pacientes de acordo com a gravidade da sintomatologia presente (Gerretsen *et al.*, 2014; Alonso-Solis *et al.*, 2015). Diante disso, nossa hipótese é de que pacientes que não apresentam curso refratário dos sintomas, representados em nossa amostra pelos pacientes sem uso de CLZ, poderiam se beneficiar mais amplamente dos efeitos terapêuticos do NPS. Essa teoria está de acordo com o efeito mais precoce, amplo e simétrico de aumento da conectividade nas regiões da DMN observado no presente estudo, assim como, com os efeitos terapêuticos inéditos, impactantes e já descritos do NPS como uma agente adjuvante efetivo sobre a sintomatologia positiva, negativa, ansiosa, depressiva e cognitiva de pacientes portadores de esquizofrenia não refratária (Hallak *et al.*, 2013). A respeito dos pacientes em uso de CLZ, nosso grupo de pesquisa também avaliou os efeitos terapêuticos adjuvantes da infusão de NPS em dois pacientes portadores de esquizofrenia refratária em uso do antipsicótico CLZ e apresentando sintomas refratários a essa droga. Os resultados apontaram uma melhora na sintomatologia positiva e negativa de ambos os pacientes com a administração aguda endovenosa contínua em baixas doses de NPS (0,5 µg/kg/minuto durante quatro horas) (Maia-De-Oliveira, Belmonte-De-Abreu, *et al.*, 2014). Apesar da amostra muito reduzida de apenas dois sujeitos, os benefícios terapêuticos do uso de NPS nesses pacientes portadores de esquizofrenia refratária foram bem mensurados e

descritos. Entretanto, os resultados não se apresentaram tão amplos em relação à melhora da sintomatologia quando comparados aos desfechos dos pacientes não refratários. Esses dados estão em concordância com o efeito do NPS mais tardio e restrito na conectividade das regiões da DMN observado em nossa amostra de pacientes em uso de CLZ e, portanto, de sujeitos refratários.

Outro ponto a ser pensado é a respeito do distinto mecanismo de ação dos antipsicóticos em uso interferir no efeito do NPS sobre a DMN. A CLZ é uma droga com perfil diferenciado e único de ação e eficácia quando comparada aos outros antipsicóticos típicos e atípicos (Wenthur e Lindsley, 2013). Uma potencial explicação para sua eficácia superior está nos seus efeitos significativos nos circuitos glutamatérgicos, sendo capaz de potencializar a neurotransmissão mediada pelo receptor NMDA. Apesar do mecanismo da CLZ de potencializar a neurotransmissão mediada pelo NMDA ainda ser desconhecido, evidências sugerem que ela pode atuar na ativação do receptor NMDA indiretamente, através da modulação dos níveis sinápticos de glutamato, glicina e D-serina, ligantes deste receptor. Uma dessas ações pode ser dar pela inibição do transportador de aminoácido neutro acoplado ao transportador de aminoácido neutro acoplado ao sódio 2 (SNAT₂), que tem grande afinidade pela glicina, aumentando assim os níveis sinápticos de glicina e, por fim, ativando os receptores NMDA (Javitt *et al.*, 2005). A circulação do principal metabólito da CLZ, o N-desmetil-clozapina, que possuiu propriedades agonistas parciais do receptor muscarínico do subtipo M₁, tem também se mostrado capaz de agir na neurotransmissão mediada pelo receptor glutamatérgico NMDA (Marino *et al.*, 1998; Sur *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2005). Além disso, Tanahashi *et al.* demonstrou que a CLZ aumentou a liberação de D-serina e L-glutamato *in vivo* e em culturas de astrócitos de ratos, melhorando assim, a neurotransmissão mediada pelos receptores NMDA (Tanahashi *et al.*, 2012).

Em relação ao mecanismo de ação antipsicótica do NPS, o mesmo ainda não é conhecido. Acredita-se que esteja relacionado com a capacidade de modular a via glutamatérgica NMDA-NO-GMPc, que estaria alterada na esquizofrenia. O NPS, como um doador de NO, aumenta a produção de GMPc e, através desse aumento, modula cascatas de proteínas quinases, fatores de transcrição e outros produtos ligados aos genes. Esses efeitos em cascata podem durar, mesmo quando o NPS não está mais agindo diretamente. Também há evidências que o NO atue diretamente nos receptores NMDA e isso possa melhorar a hipofunção desses receptores (Hoyt *et al.*, 1992; Manzoni *et al.*, 1992; Hallak *et al.*, 2013). Assim, diante da atuação glutamatérgica de ambas as drogas, CLZ e NPS, pensamos que seja

possível que essa ação diferenciada da CLZ e não compartilhada por outros antipsicóticos, já esteja causando um efeito modulatório na DMN. Por essa razão, o efeito do NPS no grupo em uso de CLZ não é tão precoce e amplo como o efeito encontrado no grupo sem uso de CLZ. Por fim, pensamos que frente à ação glutamatérgica da CLZ, um efeito adicional do NPS nessa mesma via de neurotransmissão pode se constituir uma ferramenta muito benéfica para potencialização do tratamento, principalmente nos casos de pacientes super refratários.

Ainda sobre o padrão distinto de conectividade encontrado no grupo em uso de CLZ, observamos que o aumento mais restrito da conectividade após a infusão ocorreu apenas a E quando comparado aos controles. Esse desfecho se distingue do encontrado no grupo sem uso de CLZ, no qual o aumento de conectividade foi mais amplo e se estendeu para regiões da DMN no hemisfério D e E. É importante salientar que o grupo em uso de CLZ já apresentava na fase pré-NPS as regiões do giro angular, giro supramarginal e lobo parietal inferior hiperconectadas apenas à E, como discutido anteriormente. Desta forma, o que se observou após a infusão do NPS foi uma ampliação desse padrão de maior conectividade à E, incluindo as regiões do giro temporal superior e giro temporal médio. O lobo temporal tem sido associado à capacidade de compreender o comportamento de outras pessoas, no contexto da teoria da mente, e também ao processo de autorreferência, ambos prejudicados na esquizofrenia (Olson, Plotzker e Ezzyat, 2007; Park *et al.*, 2011; Pauly *et al.*, 2014). Além disso, o lobo temporal superior E abrange o córtex auditivo, cujo funcionamento anormal tem sido associado aos sintomas positivos, especialmente às alucinações auditivas (Dierks *et al.*, 1999; Hoffman e Hampson, 2011). Assim, pensamos que o aumento de conectividade à E no grupo portador de quadro psicopatológico mais grave pode sinalizar uma tentativa de modular um funcionamento anormal de regiões implicadas na fisiopatologia da esquizofrenia, gerando uma melhora no desempenho social e na sintomatologia positiva já descrita em estudos prévios com NPS em pacientes esquizofrênicos (Hallak *et al.*, 2013; Maia-De-Oliveira, Belmonte-De-Abreu, *et al.*, 2014).

A respeito do grupo de controles saudáveis, é importante destacar que a infusão de NPS não apenas não ocasionou o mesmo padrão significativo de aumento de conectividade das regiões da DMN encontrado nos pacientes portadores de esquizofrenia, como teve um efeito oposto. Esses resultados demonstram um funcionamento distinto da DMN nos sujeitos saudáveis, sugerindo uma conectividade preservada e sem um padrão de modulação em resposta ao NPS. A única região que apresentou um aumento de conectividade após a infusão

da droga nesse grupo em relação ao grupo de pacientes sem uso de CLZ foi o giro pós-central D. Essa área cerebral pertencente ao lobo parietal divide o córtex parietal anterior e posterior. Nela encontramos o córtex somatossensorial primário, assim como a principal área receptiva sensorial dos sentidos do tato e cinestesia. Apesar do giro pós-central ser uma região que tem sido pouca investigada nas pesquisas de neuroimagem e esquizofrenia, um estudo recente apontou um menor volume dessa área no hemisfério D nos pacientes esquizofrênicos em relação aos controles (Ferro *et al.*, 2015). Somando-se aos nossos resultados, de uma maior conectividade do giro pós-central nos controles saudáveis, mais estudos se fazem necessários para avaliar a importância dessa região nos mecanismos fisiopatológicos da esquizofrenia.

A importante discrepância dos efeitos do NPS observados entre os pacientes e controles saudáveis vem embasar ainda mais as evidências da presença de alterações na DMN na esquizofrenia e dos efeitos terapêuticos dessa droga, visto que as alterações funcionais foram amplamente significativas apenas nos grupos de portadores do transtorno mental. Nesse presente estudo, as regiões cerebrais avaliadas foram aquelas pertencentes a uma das redes neurais mais estudadas na atualidade, a DMN. Apesar da heterogeneidade nos resultados dos estudos que investigam a conectividade da DMN na esquizofrenia, a presença de uma alteração do seu funcionamento nos portadores desse transtorno já é bem estabelecida (Karbassforoushan e Woodward, 2012). Apesar de ainda não ser completamente compreendida, a atividade da DMN tem sido relacionada a diversos processos mentais como a autorreferência, introspecção, memórias autobiográficas, pensamentos associativos e previsões (Gusnard e Raichle, 2001; Fox *et al.*, 2005a; Bar *et al.*, 2007; Spreng, Mar e Kim, 2009). Essa rede neural também tem sido associada à cognição espontânea e à geração de pensamentos internos (Buckner, 2013). Assim, o efeito modulatório do NPS sobre a DMN, aumentando a conectividade de regiões implicadas na fisiopatogenia da esquizofrenia, pode representar uma tentativa de "correção" das alterações da DMN presentes nesse transtorno mental, gerando assim a consistente melhora sintomatológica já descrita.

5.3 Tarefa de escuta passiva

O NPS é uma droga amplamente conhecida e utilizada como um vasodilatador direto arterial e venoso, sendo seu uso indicado principalmente em emergências hipertensivas. Seu início de ação é imediato e a dose de infusão deve ser titulada até o efeito hemodinâmico

desejado, variando no intervalo de 0,5 - 10 $\mu\text{cg/kg/minuto}$ (Vidt e Gifford, 1984; Cohn, Mcinnes e Shepherd, 2011). No presente estudo, o NPS foi utilizado em dose menores às empregadas para tratamento de quadros de hipertensão arterial graves (0,25 $\mu\text{cg/kg/minuto}$) e os voluntários foram rigorosamente monitorados nos parâmetros cardiorespiratórios. Apesar de nenhuma alteração ter sido detectada nesses parâmetros fisiológicos ao longo de todo o experimento, julgamos como imprescindível a avaliação do impacto dos efeitos de vasodilatação promovidos pelo NPS sobre os dados de RMf obtidos. Nesse sentido, a tarefa de escuta passiva teve como objetivo ampliar a segurança de que as alterações encontradas na conectividade funcional da DMN não seriam frutos exclusivos de mudanças generalizadas de fluxo sanguíneo, uma vez que independente do uso do NPS, já se conhecia a ativação esperada para a máscara do córtex auditivo.

Os resultados desse protocolo mostraram que o NPS não casou nenhum efeito vasodilatador generalizado no grupo de voluntários avaliados, ou seja, não ocorreu nenhum aumento adicional do sinal BOLD nas regiões auditivas primárias durante e/ou após a infusão da droga. Esse desfecho fortalece a teoria que o mecanismo de ação antipsicótica do NPS esteja relacionado com a capacidade de modular a via glutamatérgica NMDA-NO-GMPc, não estando assim, relacionado ao efeito vasodilatador previamente conhecido.

5.4 Limitações e força do estudo

Este estudo avaliou de forma inédita a conectividade funcional da rede DMN em resposta à administração endovenosa de NPS em voluntários saudáveis e portadores de esquizofrenia. Nossos resultados apresentaram-se consistentes e de grande importância para o aprofundamento do tema em estudo, porém, se faz necessário pontuar algumas limitações.

Em relação à seleção dos sujeitos, não foi realizado o pareamento dos voluntários entre os grupos de pacientes portadores de esquizofrenia e o grupo de controles. Isso ocorreu devido a algumas particularidades do protocolo experimental aplicado, como a necessidade de um acesso venoso periférico em ambos os membros superiores, a monitorização cardiorespiratória contínua, a infusão por via endovenosa da droga em estudo e, principalmente, ao período prolongado de tempo dentro do aparelho de ressonância magnética no qual o voluntário permanecia imóvel e sob ruídos importantes gerados pela máquina. Esses

fatores aumentaram a resistência à participação do experimento, dificultando desta forma a captação dos voluntários e pareamento dos mesmos nos grupos. Por esta razão, uma das características que variou significativamente entre os grupos de pacientes portadores de esquizofrenia e o grupo de controles foi o nível de escolaridade, possuindo todos os sujeitos saudáveis tempo de estudo maior que 11 anos, enquanto a maioria dos pacientes tinha entre 4 a 11 anos.

Outro ponto a ser considerado diz respeito à dose e ao tempo de infusão do NPS. Infundimos a dose de $0,25\mu\text{cg}/\text{kg}/\text{minuto}$ de NPS durante 12 minutos, enquanto a infusão nos ensaios clínicos prévios que geraram resultados importantes em termo de efetividade foi de $0,5\mu\text{cg}/\text{kg}/\text{minuto}$ durante quatro horas. O emprego de dose e tempo de infusão menor se fez necessário devido às limitações ligadas ao delineamento de um estudo de neuroimagem funcional. Apesar dessas diferenças, a conhecida propriedade de início de ação imediato do NPS e nossos resultados consistentes, não melhor explicados por um efeito vasodilatador da droga, fortaleceram nossos achados.

Em relação à BPRS, instrumento utilizado para avaliar as alterações psicopatológicas presentes antes e após o experimento, não observamos diferenças significativas entre os valores médios pré e pós-NPS em cada grupo de pacientes. É provável que isso tenha ocorrido pelo tempo reduzido de infusão do NPS, já que nos ensaios clínicos com tempo de infusão de quatro horas as mudanças significativas na pontuação da BPRS antes e após a infusão se fizeram presentes e duradouras. Além disso, a BPRS geralmente não é utilizada para avaliações seriadas rápidas. Entretanto, nesse contexto essa escala foi escolhida como apropriada devido sua importante capacidade de abranger um amplo espectro de sintomas da esquizofrenia.

Um outro fator a ser pontuado diz respeito à aquisição das imagens. Os voluntários saudáveis e pacientes portadores de esquizofrenia foram submetidos a um estudo de neuroimagem funcional em *resting state*, ou seja, sem a realização de qualquer tarefa cognitiva, com exceção do grupo controle que foi submetido à tarefa de escuta passiva. Assim, para o estado de repouso todos os voluntários foram orientados a permanecer relaxados, em silêncio, de olhos fechados e evitando pensamentos sistemáticos durante todo o tempo do experimento. Entretanto, a importante manipulação física empregada devido à presença da monitorização cardiorespiratória contínua, dos acessos venosos periféricos e a possível presença de ansiedade associada ao pré-conhecimento da infusão de uma nova droga,

podem ter sido fatores que interferiram no estabelecimento de um estado de repouso adequado.

Por fim, nossos resultados refletem uma amostra de portadores de esquizofrenia crônicos e com longo tempo de uso de medicações antipsicóticas. A extrapolação desses resultados deve ser cuidadosa, já que o efeito do NPS na conectividade funcional da DMN em pacientes em primeiro episódio psicótico, virgens de tratamento ou com tempo curto de doença, não foi avaliado até o momento.

O presente estudo é inédito, configurando-se assim, como o primeiro a empregar a técnica da RMf baseada no contraste BOLD para avaliar a conectividade funcional em *resting state* das regiões cerebrais pertencentes à rede neural DMN, antes, durante e após a infusão do NPS. Destaca-se que a aquisição das imagens funcionais ocorreu simultaneamente à infusão da droga em estudo, possibilitando a observação precisa e confiável da ação do NPS no SNC. O protocolo experimental também incluiu uma fase anterior à infusão da medicação, a fase pré-NPS, na qual todos os voluntários foram submetidos à aquisição de imagens funcionais simultaneamente à infusão de placebo. Desta forma, não só cada sujeito foi controle de si mesmo, como também obtivemos dados sobre a conectividade da DMN no estado de repouso de todos os voluntários, agregando assim, nossos resultados à literatura científica atual sobre o tema.

Nosso estudo avançou ao poder avaliar não somente um grupo de pacientes portadores de esquizofrenia, mas também dois subgrupos divididos segundo a medicação antipsicótica em uso. Essa característica metodológica nos permitiu investigar e identificar diferenças no efeito do NPS sobre a conectividade funcional da DMN, possivelmente relacionadas ao tratamento medicamentoso vigente. Além disso, controles saudáveis foram submetidos ao mesmo protocolo de infusão da droga e aquisição de imagens empregado nos pacientes, resultando em uma comparação consistente e confiável do efeito do NPS em portadores de esquizofrenia e em sujeitos saudáveis. Um grupo controle também foi submetido a um protocolo de tarefa de escuta passiva realizado antes, durante e após a infusão da medicação. Isso nos assegurou que as alterações da conectividade observadas não foram melhor explicadas pelo efeito vasodilatador conhecido do NPS. Por fim, durante todo o estudo não se observou qualquer efeito adverso associado ao NPS, assim como, nenhuma interação negativa entre a droga em estudo e as medicações antipsicóticas em uso pelos pacientes, reforçando novamente a segurança do uso do NPS.

O impacto dos resultados de um estudo pioneiro que apontou efeitos terapêuticos importantes do NPS na sintomatologia da esquizofrenia abriu um campo vasto para aprofundamento e busca de uma maior elucidação dos possíveis mecanismos envolvidos em sua ação (Hallak *et al.*, 2013). Nessa direção, ao investigarmos o efeito do NPS na conectividade funcional da DMN nos pacientes portadores de esquizofrenia e em voluntários saudáveis, encontramos resultados que contribuem muito para o entendimento da melhora do quadro psicopatológico constatada com uma única infusão da medicação em estudo.

CONCLUSÃO

6. Conclusão

Buscando uma maior compreensão dos efeitos terapêuticos do NPS sobre a sintomatologia da esquizofrenia, investigamos o efeito dessa droga na conectividade funcional da DMN em voluntários saudáveis e portadores de esquizofrenia. Nossos resultados apontaram um efeito significativo de aumento da conectividade nas regiões da DMN com a infusão do NPS nos pacientes portadores de esquizofrenia, especialmente no hemisfério D, enquanto esse mesmo padrão não foi encontrado nos controles saudáveis. O aumento na conectividade das regiões pertencentes à rede neural também se mostrou distinto entre os grupos de pacientes avaliados, sendo mais precoce e amplo nos pacientes que não estavam em uso de CLZ, portanto, que não apresentavam um curso refratário da doença. Também observamos que o efeito modulatório do NPS ocorreu sobre regiões da DMN já em estudo e fortemente implicadas na fisiopatogenia da esquizofrenia.

Conclui-se assim, que nossa investigação neurofuncional sobre os efeitos do NPS na conectividade funcional das regiões da DMN contribuiu para a compreensão dos efeitos terapêuticos rápidos, seguros e duradouros na sintomatologia de pacientes portadores de esquizofrenia. Nossos achados também reforçam a futura aprovação do NPS como uma nova ferramenta adjuvante no tratamento da esquizofrenia, atuando em sistemas distintos dos já muito bem conhecidos antagonistas dopaminérgicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOU-SALEH, M. T. Neuroimaging in psychiatry: An update. **J Psychosom Res**, v. 61, n. 3, p. 289-93, Sep 2006. ISSN 0022-3999.

ADLER, C. M. et al. Effects of ketamine on thought disorder, working memory, and semantic memory in healthy volunteers. **Biol Psychiatry**, v. 43, n. 11, p. 811-6, Jun 1 1998. ISSN 0006-3223.

AKYOL, O. et al. Nitric oxide as a physiopathological factor in neuropsychiatric disorders. **In Vivo**, v. 18, n. 3, p. 377-90, May-Jun 2004. ISSN 0258-851X.

ALONSO-SOLIS, A. et al. Altered default network resting state functional connectivity in patients with a first episode of psychosis. **Schizophr Res**, v. 139, n. 1-3, p. 13-8, Aug 2012.

_____. Resting-state functional connectivity alterations in the default network of schizophrenia patients with persistent auditory verbal hallucinations. **Schizophr Res**, v. 161, n. 2-3, p. 261-8, Feb 2015. ISSN 1573-2509 (Electronic).

ANDREASEN, N. C. Understanding the causes of schizophrenia. **N Engl J Med**, v. 340, n. 8, p. 645-7, Feb 25 1999. ISSN 0028-4793.

ANTROBUS, J. S. et al. Mindwandering and cognitive structure. **Trans N Y Acad Sci**, v. 32, n. 2, p. 242-52, Feb 1970. ISSN 0028-7113.

ARMSTRONG, E. et al. The ontogeny of human gyrification. **Cerebral Cortex**, v. 5, n. 1, p. 56-63, 1995. ISSN 1047-3211.

ARVANOV, V. L. et al. Clozapine and haloperidol modulate N-methyl-D-aspartate-and non-N-methyl-D-aspartate receptor-mediated neurotransmission in rat prefrontal cortical neurons in vitro. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 283, n. 1, p. 226-234, 1997. ISSN 1521-0103.

BAKKER, C. B.; AMINI, F. B. Observations on the psychotomimetic effects of Sernyl. **Compr Psychiatry**, v. 2, p. 269-80, Oct 1961. ISSN 0010-440X.

BAR, M. et al. The units of thought. **Hippocampus**, v. 17, n. 6, p. 420-428, 2007. ISSN 1098-1063.

BECH, P.; KASTRUP, M.; RAFAELSEN, O. J. Mini-compendium of rating scales for states of anxiety depression mania schizophrenia with corresponding DSM-III syndromes. **Acta Psychiatr Scand Suppl**, v. 326, p. 1-37, 1986. ISSN 0065-1591.

BEHAR, T. N. et al. Glutamate acting at NMDA receptors stimulates embryonic cortical neuronal migration. **J Neurosci**, v. 19, n. 11, p. 4449-61, Jun 1 1999. ISSN 0270-6474.

BERNSTEIN, H. G.; BOGERTS, B.; KEILHOFF, G. The many faces of nitric oxide in schizophrenia. A review. **Schizophr Res**, v. 78, n. 1, p. 69-86, Oct 1 2005. ISSN 0920-9964.

BISHARA, D.; TAYLOR, D. Upcoming agents for the treatment of schizophrenia: mechanism of action, efficacy and tolerability. **Drugs**, v. 68, n. 16, p. 2269-92, 2008. ISSN 0012-6667.

BLACK, M. D.; MATTHEWS, E. K.; HUMPHREY, P. P. The effects of a photosensitive nitric oxide donor on basal and electrically-stimulated dopamine efflux from the rat striatum in vitro. **Neuropharmacology**, v. 33, n. 11, p. 1357-65, Nov 1994. ISSN 0028-3908.

BLUHM, R. L. et al. Spontaneous low-frequency fluctuations in the BOLD signal in schizophrenic patients: anomalies in the default network. **Schizophr Bull**, v. 33, n. 4, p. 1004-12, Jul 2007. ISSN 0586-7614.

BRAFF, D. L. et al. Impact of prepulse characteristics on the detection of sensorimotor gating deficits in schizophrenia. **Schizophr Res**, v. 49, n. 1-2, p. 171-8, Apr 15 2001. ISSN 0920-9964.

BREITER, H. C. et al. Acute effects of cocaine on human brain activity and emotion. **Neuron**, v. 19, n. 3, p. 591-611, Sep 1997. ISSN 0896-6273.

BREWER, G. J.; COTMAN, C. W. NMDA receptor regulation of neuronal morphology in cultured hippocampal neurons. **Neurosci Lett**, v. 99, n. 3, p. 268-73, May 8 1989. ISSN 0304-3940.

BROYD, S. J. et al. Default-mode brain dysfunction in mental disorders: a systematic review. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 33, n. 3, p. 279-96, Mar 2009. ISSN 0149-7634.

BRUCE, M. L.; TAKEUCHI, D. T.; LEAF, P. J. Poverty and psychiatric status. Longitudinal evidence from the New Haven Epidemiologic Catchment Area study. **Arch Gen Psychiatry**, v. 48, n. 5, p. 470-4, May 1991. ISSN 0003-990X.

BRUNE, M. "Theory of mind" in schizophrenia: a review of the literature. **Schizophr Bull**, v. 31, n. 1, p. 21-42, Jan 2005. ISSN 0586-7614.

BUCHANAN, R. W. Clozapine: efficacy and safety. **Schizophr Bull**, v. 21, n. 4, p. 579-91, 1995. ISSN 0586-7614.

BUCKNER, R. L. The brain's default network: origins and implications for the study of psychosis. **Dialogues Clin Neurosci**, v. 15, n. 3, p. 351-8, Sep 2013. ISSN 1294-8322.

BUCKNER, R. L.; ANDREWS-HANNA, J. R.; SCHACTER, D. L. The brain's default network - Anatomy, function, and relevance to disease. **Year in Cognitive Neuroscience 2008**, v. 1124, p. 1-38, 2008a. ISSN 0077-8923.

_____. The brain's default network: anatomy, function, and relevance to disease. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1124, p. 1-38, Mar 2008b. ISSN 0077-8923.

BUGARSKI-KIROLA, D. et al. A phase II/III trial of bitopertin monotherapy compared with placebo in patients with an acute exacerbation of schizophrenia - results from the CandleLyte study. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 24, n. 7, p. 1024-36, Jul 2014. ISSN 0924-977X.

BUJAS-BOBANOVIC, M. et al. Blockade of phencyclidine-induced effects by a nitric oxide donor. **Br J Pharmacol**, v. 130, n. 5, p. 1005-12, Jul 2000. ISSN 0007-1188.

BULLMORE, E. T.; FRANGOU, S.; MURRAY, R. M. The dysplastic net hypothesis: an integration of developmental and dysconnectivity theories of schizophrenia. **Schizophr Res**, v. 28, n. 2-3, p. 143-56, Dec 19 1997. ISSN 0920-9964.

CALHOUN, V. D. et al. Spatial and temporal independent component analysis of functional MRI data containing a pair of task-related waveforms. **Human brain mapping**, v. 13, n. 1, p. 43-53, 2001. ISSN 1097-0193.

CAMCHONG, J. et al. Altered functional and anatomical connectivity in schizophrenia. **Schizophr Bull**, v. 37, n. 3, p. 640-50, May 2011. ISSN 0586-7614.

CARDNO, A. G. et al. Heritability estimates for psychotic disorders: the Maudsley twin psychosis series. **Arch Gen Psychiatry**, v. 56, n. 2, p. 162-8, Feb 1999. ISSN 0003-990X.

CHANG, X. et al. Altered default mode and fronto-parietal network subsystems in patients with schizophrenia and their unaffected siblings. **Brain Res**, v. 1562, p. 87-99, May 8 2014. ISSN 1872-6240.

CHIUEH, C. C. Neuroprotective properties of nitric oxide. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 890, n. 1, p. 301-311, 1999. ISSN 1749-6632.

CHOWDHARY, S. et al. Nitric oxide and cardiac autonomic control in humans. **Hypertension**, v. 36, n. 2, p. 264-9, Aug 2000. ISSN 0194-911X.

COHEN, B. D. et al. Comparison of phencyclidine hydrochloride (Sernyl) with other drugs. Simulation of schizophrenic performance with phencyclidine hydrochloride (Sernyl), lysergic acid diethylamide (LSD-25), and amobarbital (Amytal) sodium; II. Symbolic and sequential thinking. **Arch Gen Psychiatry**, v. 6, p. 395-401, May 1962. ISSN 0003-990X.

COHN, J. N.; BURKE, L. P. Nitroprusside. **Annals of internal medicine**, v. 91, n. 5, p. 752-757, 1979. ISSN 0003-4819.

COHN, J. N.; MCINNES, G. T.; SHEPHERD, A. M. Direct-acting vasodilators. **J Clin Hypertens (Greenwich)**, v. 13, n. 9, p. 690-2, Sep 2011. ISSN 1524-6175.

COYLE, J. T. The glutamatergic dysfunction hypothesis for schizophrenia. **Harv Rev Psychiatry**, v. 3, n. 5, p. 241-53, Jan-Feb 1996. ISSN 1067-3229.

CREESE, I.; BURT, D. R.; SNYDER, S. H. Dopamine receptor binding predicts clinical and pharmacological potencies of antischizophrenic drugs. **Science**, v. 192, n. 4238, p. 481-3, Apr 30 1976. ISSN 0036-8075.

CROW, T. J. Auditory hallucinations as primary disorders of syntax: an evolutionary theory of the origins of language. In: (Ed.). **Cogn Neuropsychiatry**. England, v.9, 2004. p.125-45. ISBN 1354-6805.

_____. Cerebral asymmetry and the lateralization of language: core deficits in schizophrenia as pointers to the gene. **Current Opinion in Psychiatry**, v. 17, n. 2, p. 97-106, 2004. ISSN 0951-7367.

CURRY, S. C.; ARNOLD-CAPELL, P. Toxic effects of drugs used in the ICU. Nitroprusside, nitroglycerin, and angiotensin-converting enzyme inhibitors. **Critical care clinics**, v. 7, n. 3, p. 555-581, 1991. ISSN 0749-0704.

DAWSON, T. M.; SNYDER, S. H. Gases as biological messengers: nitric oxide and carbon monoxide in the brain. **J Neurosci**, v. 14, n. 9, p. 5147-59, Sep 1994. ISSN 0270-6474.

DEL-BEN, C. M. et al. Confiabilidade Teste-Reteste da Entrevista Clínica Estruturada para o DSM-IV – Versão Clínica (SCID-CV) Traduzida para o Português. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 23, p. 4, 2001.

DIERKS, T. et al. Activation of Heschl's gyrus during auditory hallucinations. **Neuron**, v. 22, n. 3, p. 615-21, Mar 1999. ISSN 0896-6273.

DIRNBERGER, E. et al. Effects of nitroglycerin and sodium nitroprusside on endexpiratory concentrations of nitric oxide in healthy humans. **Life Sci**, v. 62, n. 8, p. P1103-8, 1998. ISSN 0024-3205.

EBSTEIN, R. P. et al. Cyclic GMP in the CSF of patients with schizophrenia before and after neuroleptic treatment. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 51, n. 1, p. 71-4, Dec 21 1976. ISSN 0033-3158.

FAKRA, E.; AZORIN, J. M. Clozapine for the treatment of schizophrenia. **Expert Opin Pharmacother**, v. 13, n. 13, p. 1923-35, Sep 2012. ISSN 1465-6566.

FERRO, A. et al. A cross-sectional and longitudinal structural magnetic resonance imaging study of the post-central gyrus in first-episode schizophrenia patients. **Psychiatry Res**, v. 231, n. 1, p. 42-9, Jan 30 2015. ISSN 0165-1781.

FIRST, M. B. et al. **Structured Clinical Interview for DSM-IV-TR Axis I Disorders, Clinical Version (SCID-CV)**. New York: Biometrics Research, New York State Psychiatric Institute, 1997.

FOX, M. D.; RAICHLE, M. E. Spontaneous fluctuations in brain activity observed with functional magnetic resonance imaging. **Nat Rev Neurosci**, v. 8, n. 9, p. 700-11, Sep 2007. ISSN 1471-003X.

FOX, M. D. et al. The human brain is intrinsically organized into dynamic, anticorrelated functional networks. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 27, p. 9673-8, Jul 5 2005a. ISSN 0027-8424.

_____. The human brain is intrinsically organized into dynamic, anticorrelated functional networks. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 27, p. 9673-9678, Jul 5 2005b. ISSN 0027-8424.

FRIEDERICH, J. A.; BUTTERWORTH, J. F. Sodium nitroprusside: twenty years and counting. **Anesthesia & Analgesia**, v. 81, n. 1, p. 152-162, 1995. ISSN 0003-2999.

FRISTON, K. J. Functional and effective connectivity in neuroimaging: a synthesis. **Human brain mapping**, v. 2, n. 1-2, p. 56-78, 1994. ISSN 1097-0193.

FRITH, C. D. **The Cognitive Neuropsychology of Schizophrenia. 1992**: Hove, UK: Lawrence Erlbaum Associates.

FRITH, U.; FRITH, C. D. Development and neurophysiology of mentalizing. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 358, n. 1431, p. 459-73, Mar 29 2003. ISSN 0962-8436.

FRITH, U.; MORTON, J.; LESLIE, A. M. The cognitive basis of a biological disorder: Autism. **Trends in neurosciences**, v. 14, n. 10, p. 433-438, 1991. ISSN 0166-2236.

GALLY, J. A. et al. The NO hypothesis: possible effects of a short-lived, rapidly diffusible signal in the development and function of the nervous system. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 87, n. 9, p. 3547-51, May 1990. ISSN 0027-8424.

GARCIA, G. J. et al. Structural and functional neuroimaging findings associated with the use of clozapine in schizophrenia: a systematic review. **Rev Bras Psiquiatr**, v. 37, n. 1, p. 71-9, Jan-Mar 2015. ISSN 1809-452X.

GARTHWAITE, J. Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. **Trends Neurosci**, v. 14, n. 2, p. 60-7, Feb 1991. ISSN 0166-2236.

GERRETSEN, P. et al. Impaired insight into illness and cognitive insight in schizophrenia spectrum disorders: resting state functional connectivity. **Schizophr Res**, v. 160, n. 1-3, p. 43-50, Dec 2014. ISSN 1573-2509.

GOTTESMAN, II; ERLLENMEYER-KIMLING, L. Family and twin strategies as a head start in defining prodromes and endophenotypes for hypothetical early-interventions in schizophrenia. **Schizophr Res**, v. 51, n. 1, p. 93-102, Aug 1 2001. ISSN 0920-9964.

GRASBY, P. M. et al. The effect of the dopamine agonist, apomorphine, on regional cerebral blood flow in normal volunteers. **Psychol Med**, v. 23, n. 3, p. 605-12, Aug 1993. ISSN 0033-2917.

GRUZELIER, J. H. Functional neuropsychophysiological asymmetry in schizophrenia: a review and reorientation. **Schizophr Bull**, v. 25, n. 1, p. 91-120, 1999. ISSN 0586-7614.

GUSNARD, D. A.; RAICHLE, M. E. Searching for a baseline: functional imaging and the resting human brain. **Nat Rev Neurosci**, v. 2, n. 10, p. 685-94, Oct 2001. ISSN 1471-003X.

HALL, V. A.; GUEST, J. M. Sodium nitroprusside-induced cyanide intoxication and prevention with sodium thiosulfate prophylaxis. **American Journal of Critical Care**, v. 1, n. 2, p. 19-25, 1992. ISSN 1062-3264.

HALLAK, J. E. et al. Rapid improvement of acute schizophrenia symptoms after intravenous sodium nitroprusside: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **JAMA Psychiatry**, v. 70, n. 7, p. 668-76, Jul 2013. ISSN 2168-622x.

HARA, H. et al. Brain distribution of nitric oxide synthase in neuronal or endothelial nitric oxide synthase mutant mice using [3H]L-NG-nitro-arginine autoradiography. **Neuroscience**, v. 75, n. 3, p. 881-90, Dec 1996. ISSN 0306-4522.

HE, Z. et al. Aberrant intrinsic brain activity and cognitive deficit in first-episode treatment-naive patients with schizophrenia. **Psychol Med**, v. 43, n. 4, p. 769-80, Apr 2013. ISSN 0033-2917.

HESS, D. T. et al. Neuronal growth cone collapse and inhibition of protein fatty acylation by nitric oxide. **Nature**, v. 366, n. 6455, p. 562-5, Dec 9 1993. ISSN 0028-0836.

HIMWICH, W. A.; SAUNDERS, J. P. Enzymatic conversion of cyanide to thiocyanate. **Am J Physiol**, v. 153, n. 2, p. 348-54, 1948.

HINDLEY, S. et al. Nitric oxide donors enhance neurotrophin-induced neurite outgrowth through a cGMP-dependent mechanism. **J Neurosci Res**, v. 47, n. 4, p. 427-39, Feb 15 1997. ISSN 0360-4012.

HOFFMAN, R. E.; HAMPSON, M. Functional connectivity studies of patients with auditory verbal hallucinations. **Front Hum Neurosci**, v. 6, p. 6, Dec 2 2011. ISSN 1662-5161.

HOLSCHER, C. Nitric oxide, the enigmatic neuronal messenger: its role in synaptic plasticity. **Trends Neurosci**, v. 20, n. 7, p. 298-303, Jul 1997. ISSN 0166-2236.

HORWITZ, B. The elusive concept of brain connectivity. **Neuroimage**, v. 19, n. 2 Pt 1, p. 466-70, Jun 2003. ISSN 1053-8119.

HOYT, K. R. et al. Nitric oxide modulates NMDA-induced increases in intracellular Ca²⁺ in cultured rat forebrain neurons. **Brain Res**, v. 592, n. 1-2, p. 310-6, Oct 2 1992. ISSN 0006-8993.

INSEL, T. R. Rethinking schizophrenia. **Nature**, v. 468, n. 7321, p. 187-93, Nov 11 2010. ISSN 0028-0836.

ISSY, A. C. et al. Critical role of nitric oxide in the modulation of prepulse inhibition in Swiss mice. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 231, n. 4, p. 663-72, Feb 2014. ISSN 0033-3158.

IVANKOVICH, A. D. et al. Sodium thiosulfate disposition in humans: relation to sodium nitroprusside toxicity. **Anesthesiology**, v. 58, n. 1, p. 11-17, 1983. ISSN 0003-3022.

IVANKOVICH, A. D.; MILETICH, D. J.; TINKER, J. H. Sodium nitroprusside: metabolism and general considerations. **International anesthesiology clinics**, v. 16, n. 2, p. 1-30, 1978. ISSN 0020-5907.

JABLENSKY, A. Schizophrenia: epidemiology. **Current Opinion in Psychiatry**, v. 12, n. 1, p. 19-28, 1999. ISSN 0951-7367.

JAFRI, M. J. et al. A method for functional network connectivity among spatially independent resting-state components in schizophrenia. **Neuroimage**, v. 39, n. 4, p. 1666-81, Feb 15 2008. ISSN 1053-8119.

JAVITT, D. C. Glutamatergic theories of schizophrenia. **Isr J Psychiatry Relat Sci**, v. 47, n. 1, p. 4-16, 2010. ISSN 0333-7308.

JAVITT, D. C. et al. Inhibition of system A-mediated glycine transport in cortical synaptosomes by therapeutic concentrations of clozapine: implications for mechanisms of action. **Mol Psychiatry**, v. 10, n. 3, p. 275-87, Mar 2005. ISSN 1359-4184.

JAVITT, D. C.; ZUKIN, S. R. Recent advances in the phencyclidine model of schizophrenia. **Am J Psychiatry**, v. 148, n. 10, p. 1301-1308, 1991.

JENKINSON, M. et al. Improved optimization for the robust and accurate linear registration and motion correction of brain images. **Neuroimage**, v. 17, n. 2, p. 825-841, Oct 2002. ISSN 1053-8119.

JENKINSON, M.; SMITH, S. A global optimisation method for robust affine registration of brain images. **Medical Image Analysis**, v. 5, n. 2, p. 143-156, Jun 2001. ISSN 1361-8415.

KAMPE, K. K.; FRITH, C. D.; FRITH, U. "Hey John": signals conveying communicative intention toward the self activate brain regions associated with "mentalizing," regardless of modality. In: (Ed.). **J Neurosci**. United States, v.23, 2003. p.5258-63. ISBN 1529-2401.

KANDRATAVICIUS, L. et al. Effects of nitric oxide-related compounds in the acute ketamine animal model of schizophrenia. **BMC Neurosci**, v. 16, p. 9, 2015. ISSN 1471-2202.

KANE, J. M.; CORRELL, C. U. Past and present progress in the pharmacologic treatment of schizophrenia. **J Clin Psychiatry**, v. 71, n. 9, p. 1115-24, Sep 2010. ISSN 0160-6689.

KARBASFOROUSHAN, H.; WOODWARD, N. D. Resting-state networks in schizophrenia. **Curr Top Med Chem**, v. 12, n. 21, p. 2404-14, 2012. ISSN 1568-0266.

KASPAREK, T. et al. Brain functional connectivity of male patients in remission after the first episode of schizophrenia. **Hum Brain Mapp**, v. 34, n. 3, p. 726-37, Mar 2013. ISSN 1065-9471.

KE, M. et al. Bilateral functional asymmetry disparity in positive and negative schizophrenia revealed by resting-state fMRI. In: (Ed.). **Psychiatry Res**. Ireland: @ 2009 Elsevier Ireland Ltd, v.182, 2010. p.30-9. ISBN 0165-1781.

KENDELL, R. E. Diagnosis and classification of functional psychoses. **Br Med Bull**, v. 43, n. 3, p. 499-513, Jul 1987. ISSN 0007-1420.

KESHAVAN, M. S. et al. Schizophrenia, "just the facts": what we know in 2008 Part 3: neurobiology. **Schizophr Res**, v. 106, n. 2-3, p. 89-107, Dec 2008. ISSN 0920-9964.

KHADKA, S. et al. Is aberrant functional connectivity a psychosis endophenotype? A resting state functional magnetic resonance imaging study. **Biol Psychiatry**, v. 74, n. 6, p. 458-66, Sep 15 2013. ISSN 0006-3223.

KHANNA, N. et al. Functional Neuroimaging: Fundamental Principles and Clinical Applications. **Neuroradiol J**, v. 28, n. 2, p. 87-96, Apr 2015. ISSN 1971-4009.

KIM, J. S. et al. Low cerebrospinal fluid glutamate in schizophrenic patients and a new hypothesis on schizophrenia. **Neurosci Lett**, v. 20, n. 3, p. 379-82, Dec 1980. ISSN 0304-3940.

KINDLER, J. et al. Static and dynamic characteristics of cerebral blood flow during the resting state in schizophrenia. In: (Ed.). **Schizophr Bull**. United States: The Author 2013. Published by Oxford University Press on behalf of the Maryland Psychiatric Research Center For permissions, please email: journals.permissions@oup.com., v.41, 2015. p.163-70. ISBN 1745-1701.

KIRCHER, T. T. et al. Reversed lateralization of temporal activation during speech production in thought disordered patients with schizophrenia. **Psychol Med**, v. 32, n. 3, p. 439-49, Apr 2002. ISSN 0033-2917.

KLECKNER, N. W.; DINGLELINE, R. Requirement for glycine in activation of NMDA-receptors expressed in *Xenopus* oocytes. **Science**, v. 241, n. 4867, p. 835-7, Aug 12 1988. ISSN 0036-8075.

KONRADI, C.; HECKERS, S. Molecular aspects of glutamate dysregulation: implications for schizophrenia and its treatment. **Pharmacol Ther**, v. 97, n. 2, p. 153-79, Feb 2003. ISSN 0163-7258.

KOSTER, L. S.; CARBON, M.; CORRELL, C. U. Emerging drugs for schizophrenia: an update. **Expert Opin Emerg Drugs**, v. 19, n. 4, p. 511-31, Dec 2014. ISSN 1472-8214.

KRYSTAL, J. H. et al. NMDA receptor antagonist effects, cortical glutamatergic function, and schizophrenia: toward a paradigm shift in medication development. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 169, n. 3-4, p. 215-33, Sep 2003. ISSN 0033-3158.

_____. Subanesthetic effects of the noncompetitive NMDA antagonist, ketamine, in humans. Psychotomimetic, perceptual, cognitive, and neuroendocrine responses. **Arch Gen Psychiatry**, v. 51, n. 3, p. 199-214, Mar 1994. ISSN 0003-990X.

KULIG, K. Cyanide antidotes and fire toxicology. **Fire technology**, v. 28, n. 4, p. 369-372, 1992. ISSN 0015-2684.

KWON, J. S. et al. Left planum temporale volume reduction in schizophrenia. **Arch Gen Psychiatry**, v. 56, n. 2, p. 142-8, Feb 1999. ISSN 0003-990X.

LAHTI, A. C. et al. Ketamine activates psychosis and alters limbic blood flow in schizophrenia. **Neuroreport**, v. 6, n. 6, p. 869-72, Apr 19 1995. ISSN 0959-4965.

LAIRD, A. R. et al. Investigating the Functional Heterogeneity of the Default Mode Network Using Coordinate-Based Meta-Analytic Modeling. **Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 46, p. 14496-14505, Nov 18 2009. ISSN 0270-6474.

LARUELLE, M. Schizophrenia: from dopaminergic to glutamatergic interventions. **Curr Opin Pharmacol**, v. 14, p. 97-102, Feb 2014. ISSN 1471-4892.

LEE, B. H.; KIM, Y. K. Reduced plasma nitric oxide metabolites before and after antipsychotic treatment in patients with schizophrenia compared to controls. **Schizophr Res**, v. 104, n. 1-3, p. 36-43, Sep 2008.

LESLIE, R. A.; JAMES, M. F. Pharmacological magnetic resonance imaging: a new application for functional MRI. **Trends Pharmacol Sci**, v. 21, n. 8, p. 314-8, Aug 2000. ISSN 0165-6147.

LEWIS, D. A.; LEVITT, P. Schizophrenia as a disorder of neurodevelopment. **Annu Rev Neurosci**, v. 25, p. 409-32, 2002. ISSN 0147-006X.

LI, Z. et al. N-desmethylclozapine, a major metabolite of clozapine, increases cortical acetylcholine and dopamine release in vivo via stimulation of M1 muscarinic receptors. **Neuropsychopharmacology**, v. 30, n. 11, p. 1986-95, Nov 2005. ISSN 0893-133X.

LIEBERMAN, J. A.; KANE, J. M.; ALVIR, J. Provocative tests with psychostimulant drugs in schizophrenia. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 91, n. 4, p. 415-33, 1987. ISSN 0033-3158.

LIEMBURG, E. J. et al. Reduced connectivity in the self-processing network of schizophrenia patients with poor insight. **PLoS One**, v. 7, n. 8, p. e42707, 2012. ISSN 1932-6203.

LINDSLEY, C. W. et al. Progress towards validating the NMDA receptor hypofunction hypothesis of schizophrenia. **Curr Top Med Chem**, v. 6, n. 8, p. 771-85, 2006. ISSN 1568-0266.

LONART, G.; WANG, J.; JOHNSON, K. M. Nitric oxide induces neurotransmitter release from hippocampal slices. **Eur J Pharmacol**, v. 220, n. 2-3, p. 271-2, Sep 22 1992. ISSN 0014-2999.

LOWE, M. J. The emergence of doing "nothing" as a viable paradigm design. **Neuroimage**, v. 62, n. 2, p. 1146-51, Aug 15 2012. ISSN 1053-8119.

LOWENSTEIN, C. J.; SNYDER, S. H. Nitric oxide, a novel biologic messenger. **Cell**, v. 70, n. 5, p. 705-7, Sep 4 1992. ISSN 0092-8674.

LUCIGNANI, G.; BASTIANELLO, S. Pharmacological MRI: a biomarker in CNS drug discovery and development? In: (Ed.). **Funct Neurol**. Italy, v.22, 2007. p.71-3. ISBN 0393-5264.

MAIA-DE-OLIVEIRA, J. P. et al. The effects of sodium nitroprusside treatment on cognitive deficits in schizophrenia: a pilot study. **J Clin Psychopharmacol**, v. 35, n. 1, p. 83-5, Feb 2015. ISSN 1533-712X.

_____. Sodium nitroprusside treatment of clozapine-refractory schizophrenia. **J Clin Psychopharmacol**, v. 34, n. 6, p. 761-3, Dec 2014. ISSN 1533-712X.

_____. Sodium nitroprusside, a nitric oxide donor for novel treatment of schizophrenia, may also modulate dopaminergic systems. **Schizophr Res**, v. 159, n. 2-3, p. 558-9, Nov 2014. ISSN 1573-2509.

_____. Nitroprusside single-dose prevents the psychosis-like behavior induced by ketamine in rats for up to one week. **Schizophr Res**, v. 162, n. 1-3, p. 211-5, Mar 2015. ISSN 1573-2509.

_____. Nitric oxide plasma/serum levels in patients with schizophrenia: a systematic review and meta-analysis. **Rev Bras Psiquiatr**, v. 34 Suppl 2, p. S149-55, Oct 2012. ISSN 1516-4446.

MALHOTRA, A. K. et al. Ketamine-induced exacerbation of psychotic symptoms and cognitive impairment in neuroleptic-free schizophrenics. **Neuropsychopharmacology**, v. 17, n. 3, p. 141-50, Sep 1997. ISSN 0893-133X.

MANNELL, M. V. et al. Resting state and task-induced deactivation: A methodological comparison in patients with schizophrenia and healthy controls. **Hum Brain Mapp**, v. 31, n. 3, p. 424-37, Mar 2010. ISSN 1065-9471.

MANOLIU, A. et al. Insular Dysfunction Reflects Altered Between-Network Connectivity and Severity of Negative Symptoms in Schizophrenia during Psychotic Remission. **Front Hum Neurosci**, v. 7, p. 216, 2013. ISSN 1662-5161.

_____. Aberrant Dependence of Default Mode/Central Executive Network Interactions on Anterior Insular Salience Network Activity in Schizophrenia. **Schizophr Bull**, Mar 21 2013. ISSN 0586-7614.

MANZONI, O. et al. Sodium nitroprusside blocks NMDA receptors via formation of ferrocyanide ions. **Neuroreport**, v. 3, n. 1, p. 77-80, Jan 1992. ISSN 0959-4965.

MARINO, M. J.; CONN, P. J. Direct and indirect modulation of the N-methyl D-aspartate receptor. **Curr Drug Targets CNS Neurol Disord**, v. 1, n. 1, p. 1-16, Feb 2002. ISSN 1568-007X.

MARINO, M. J. et al. Activation of the genetically defined m1 muscarinic receptor potentiates N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor currents in hippocampal pyramidal cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, n. 19, p. 11465-70, Sep 15 1998. ISSN 0027-8424.

MATTHYSSE, S. Antipsychotic drug actions: a clue to the neuropathology of schizophrenia? **Fed Proc**, v. 32, n. 2, p. 200-5, Feb 1973. ISSN 0014-9446.

MCGLASHAN, T. H. Eugen Bleuler: centennial anniversary of his 1911 publication of Dementia Praecox or the group of schizophrenias. **Schizophr Bull**, v. 37, n. 6, p. 1101-3, Nov 2011. ISSN 0586-7614.

MCGUFFIN, P.; OWEN, M. J.; FARMER, A. E. Genetic basis of schizophrenia. **Lancet**, v. 346, n. 8976, p. 678-82, Sep 9 1995. ISSN 0140-6736.

MCGUIRE, P. et al. Functional neuroimaging in schizophrenia: diagnosis and drug discovery. **Trends Pharmacol Sci**, v. 29, n. 2, p. 91-8, Feb 2008. ISSN 0165-6147.

MCKEOWN, M. J. et al. **Analysis of fMRI data by blind separation into independent spatial components**. DTIC Document. 1997.

MEDA, S. A. et al. Multivariate analysis reveals genetic associations of the resting default mode network in psychotic bipolar disorder and schizophrenia. In: (Ed.). **Proc Natl Acad Sci U S A**. United States, v.111, 2014. p.E2066-75. ISBN 1091-6490.

MELONE, M.; BRAGINA, L.; CONTI, F. Clozapine-induced reduction of glutamate transport in the frontal cortex is not mediated by GLAST and EAAC1. In: (Ed.). **Mol Psychiatry**. England, v.8, 2003. p.12-3. ISBN 1359-4184.

MELTZER, H. Y. Relevance of dopamine autoreceptors for psychiatry: preclinical and clinical studies. **Schizophr Bull**, v. 6, n. 3, p. 456-75, 1980. ISSN 0586-7614.

_____. Treatment-resistant schizophrenia--the role of clozapine. **Curr Med Res Opin**, v. 14, n. 1, p. 1-20, 1997. ISSN 0300-7995.

_____. The role of serotonin in antipsychotic drug action. **Neuropsychopharmacology**, v. 21, n. 2 Suppl, p. 106s-115s, Aug 1999. ISSN 0893-133X.

MELTZER, H. Y.; STAHL, S. M. The dopamine hypothesis of schizophrenia: a review. **Schizophr Bull**, v. 2, n. 1, p. 19-76, 1976. ISSN 0586-7614.

MEYER, J. H.; KENNEDY, S.; BROWN, G. M. No effect of depression on [(15)O]H₂O PET response to intravenous d-fenfluramine. **Am J Psychiatry**, v. 155, n. 9, p. 1241-6, Sep 1998. ISSN 0002-953X.

MINGOIA, G. et al. Default mode network activity in schizophrenia studied at resting state using probabilistic ICA. **Schizophr Res**, v. 138, n. 2-3, p. 143-9, Jul 2012.

MITCHELL, R. L.; CROW, T. J. Right hemisphere language functions and schizophrenia: the forgotten hemisphere? In: (Ed.). **Brain**. England, v.128, 2005. p.963-78. ISBN 1460-2156.

MOGHADDAM, B. Bringing order to the glutamate chaos in schizophrenia. **Neuron**, v. 40, n. 5, p. 881-4, Dec 4 2003. ISSN 0896-6273.

MOORE, H.; WEST, A. R.; GRACE, A. A. The regulation of forebrain dopamine transmission: relevance to the pathophysiology and psychopathology of schizophrenia. **Biol Psychiatry**, v. 46, n. 1, p. 40-55, Jul 1 1999. ISSN 0006-3223.

MUESER, K. T.; MCGURK, S. R. Schizophrenia. **Lancet**, v. 363, n. 9426, p. 2063-72, Jun 19 2004. ISSN 0140-6736.

MURAD, F. Cyclic guanosine monophosphate as a mediator of vasodilation. **Journal of Clinical Investigation**, v. 78, n. 1, p. 1, 1986.

MURRAY, C. J. L.; LOPEZ, A. D. The global burden of disease and injury series, volume 1: a comprehensive assessment of mortality and disability from diseases, injuries, and risk factors in 1990 and projected to 2020. **Cambridge, MA**, 1996.

NAHEED, M.; GREEN, B. Focus on clozapine. **Curr Med Res Opin**, v. 17, n. 3, p. 223-9, 2001. ISSN 0300-7995.

NEWCOMER, J. W. et al. Ketamine-induced NMDA receptor hypofunction as a model of memory impairment and psychosis. **Neuropsychopharmacology**, v. 20, n. 2, p. 106-18, Feb 1999. ISSN 0893-133X.

NONG, Y. et al. Glycine binding primes NMDA receptor internalization. **Nature**, v. 422, n. 6929, p. 302-7, Mar 20 2003. ISSN 0028-0836.

NORRIS, D. G. Principles of magnetic resonance assessment of brain function. **J Magn Reson Imaging**, v. 23, n. 6, p. 794-807, Jun 2006. ISSN 1053-1807.

NUNES, E. A. et al. D-serine and schizophrenia: an update. **Expert Rev Neurother**, v. 12, n. 7, p. 801-12, Jul 2012. ISSN 1473-7175.

OGILVIE, P. et al. Induction and variants of neuronal nitric oxide synthase type I during synaptogenesis. **FASEB j**, v. 9, n. 9, p. 799-806, Jun 1995. ISSN 0892-6638.

OLIVEIRA, J. P.; ZUARDI, A. W.; HALLAK, J. E. Role of nitric oxide in patients with schizophrenia-a systematic review of the literature. **Current Psychiatry Reviews**, v. 4, n. 4, p. 219-227, 2008. ISSN 1573-4005.

OLNEY, J. W.; FARBER, N. B. Glutamate receptor dysfunction and schizophrenia. **Arch Gen Psychiatry**, v. 52, n. 12, p. 998-1007, Dec 1995. ISSN 0003-990X.

OLSON, I. R.; PLOTZKER, A.; EZZYAT, Y. The Enigmatic temporal pole: a review of findings on social and emotional processing. **Brain**, v. 130, n. Pt 7, p. 1718-31, Jul 2007. ISSN 0006-8950.

ONGUR, D. et al. Default mode network abnormalities in bipolar disorder and schizophrenia. **Psychiatry Res**, v. 183, n. 1, p. 59-68, Jul 30 2010. ISSN 0165-1781.

ORLIAC, F. et al. Links among resting-state default-mode network, salience network, and symptomatology in schizophrenia. **Schizophr Res**, v. 148, n. 1-3, p. 74-80, Aug 2013.

OVERALL, J. E.; GORHAM, D. R. The brief psychiatric rating scale. **Psychological reports**, v. 10, n. 3, p. 799-812, 1962. ISSN 0031-5125.

OWEN, M. J.; WILLIAMS, N. M.; O'DONOVAN, M. C. The molecular genetics of schizophrenia: new findings promise new insights. **Mol Psychiatry**, v. 9, n. 1, p. 14-27, Jan 2004. ISSN 1359-4184.

PARK, I. H. et al. Disrupted theory of mind network processing in response to idea of reference evocation in schizophrenia. **Acta Psychiatr Scand**, v. 123, n. 1, p. 43-54, Jan 2011. ISSN 0001-690x.

PAULY, K. D. et al. Me, myself and I: temporal dysfunctions during self-evaluation in patients with schizophrenia. **Soc Cogn Affect Neurosci**, v. 9, n. 11, p. 1779-88, Nov 2014. ISSN 1749-5016.

PILOWSKY, L. S.; KERWIN, R. W.; MURRAY, R. M. Schizophrenia: a neurodevelopmental perspective. **Neuropsychopharmacology**, v. 9, n. 1, p. 83-91, Aug 1993. ISSN 0893-133X.

PINES, K. L.; CRYMBLE, M. M. In vitro conversion of thiocyanate to cyanide in the presence of erythrocytes. **Experimental Biology and Medicine**, v. 81, n. 1, p. 160-162, 1952. ISSN 1535-3702.

PIROTTE, B. et al. AMPA receptor positive allosteric modulators: a patent review. **Expert Opin Ther Pat**, v. 23, n. 5, p. 615-28, May 2013. ISSN 1354-3776.

PITSIKAS, N. The role of nitric oxide donors in schizophrenia: Basic studies and clinical applications. **Eur J Pharmacol**, v. 766, p. 106-13, Nov 5 2015. ISSN 0014-2999.

PITSIKAS, N.; ZISOPOULOU, S.; SAKELLARIDIS, N. Nitric oxide donor molsidomine attenuates psychotomimetic effects of the NMDA receptor antagonist MK-801. **J Neurosci Res**, v. 84, n. 2, p. 299-305, Aug 1 2006. ISSN 0360-4012.

PYCOCK, C. J.; KERWIN, R. W.; CARTER, C. J. Effect of lesion of cortical dopamine terminals on subcortical dopamine receptors in rats. **Nature**, v. 286, n. 5768, p. 74-6, Jul 3 1980. ISSN 0028-0836.

RAICHLE, M. E. et al. A default mode of brain function. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 2, p. 676-82, Jan 16 2001. ISSN 0027-8424.

RAICHLE, M. E.; SNYDER, A. Z. A default mode of brain function: a brief history of an evolving idea. **Neuroimage**, v. 37, n. 4, p. 1083-90; discussion 1097-9, Oct 1 2007. ISSN 1053-8119.

RAZAVI, N. et al. Shifted coupling of EEG driving frequencies and fMRI resting state networks in schizophrenia spectrum disorders. In: (Ed.). **PLoS One**. United States, v.8, 2013. p.e76604. ISBN 1932-6203.

RIBOLSI, M. et al. Abnormal asymmetry of brain connectivity in schizophrenia. **Front Hum Neurosci**, v. 8, p. 1010, 2014. ISSN 1662-5161.

ROTARSKA-JAGIELA, A. et al. Resting-state functional network correlates of psychotic symptoms in schizophrenia. **Schizophr Res**, v. 117, n. 1, p. 21-30, Mar 2010.

SARABI, M.; LIND, L. Mental stress opposes endothelium-dependent vasodilation in young healthy individuals. **Vasc Med**, v. 6, n. 1, p. 3-7, 2001. ISSN 1358-863X.

SAYED, Y.; GARRISON, J. M. The dopamine hypothesis of schizophrenia and the antagonistic action of neuroleptic drugs--a review. **Psychopharmacol Bull**, v. 19, n. 2, p. 283-8, Spring 1983. ISSN 0048-5764.

SCHMETTERER, L. et al. Effect of isoproterenol, phenylephrine, and sodium nitroprusside on fundus pulsations in healthy volunteers. **Br J Ophthalmol**, v. 80, n. 3, p. 217-23, Mar 1996. ISSN 0007-1161.

SCHOLL, B. J.; LESLIE, A. M. Modularity, development and 'theory of mind'. **Mind & Language**, v. 14, n. 1, p. 131-153, 1999. ISSN 1468-0017.

SCHULTZ, S. K.; ANDREASEN, N. C. Schizophrenia. **Lancet**, v. 353, n. 9162, p. 1425-30, Apr 24 1999. ISSN 0140-6736.

SEEMAN, P. Brain dopamine receptors. **Pharmacol Rev**, v. 32, n. 3, p. 229-313, Sep 1980. ISSN 0031-6997.

_____. Dopamine receptors and the dopamine hypothesis of schizophrenia. **Synapse**, v. 1, n. 2, p. 133-52, 1987. ISSN 0887-4476.

SEEMAN, P.; CORBETT, R.; VAN TOL, H. H. Atypical neuroleptics have low affinity for dopamine D2 receptors or are selective for D4 receptors. **Neuropsychopharmacology**, v. 16, n. 2, p. 93-110; discussion 111-35, Feb 1997. ISSN 0893-133X .

SESACK, S. R. et al. Anatomical substrates for glutamate-dopamine interactions: evidence for specificity of connections and extrasynaptic actions. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1003, p. 36-52, Nov 2003. ISSN 0077-8923.

SHAH, Y. B.; MARSDEN, C. A. The application of functional magnetic resonance imaging to neuropharmacology. **Curr Opin Pharmacol**, v. 4, n. 5, p. 517-21, Oct 2004. ISSN 1471-4892.

SHARMA, T. Insights and treatment options for psychiatric disorders guided by functional MRI. **J Clin Invest**, v. 112, n. 1, p. 10-8, Jul 2003. ISSN 0021-9738.

SINGH, S. P.; SINGH, V. Meta-analysis of the efficacy of adjunctive NMDA receptor modulators in chronic schizophrenia. **CNS Drugs**, v. 25, n. 10, p. 859-85, Oct 1 2011. ISSN 1172-7047.

SKUDLARSKI, P. et al. Brain connectivity is not only lower but different in schizophrenia: a combined anatomical and functional approach. **Biol Psychiatry**, v. 68, n. 1, p. 61-9, Jul 1 2010. ISSN 0006-3223.

SMALLWOOD, J.; SCHOOLER, J. W. The restless mind. **Psychol Bull**, v. 132, n. 6, p. 946-58, Nov 2006. ISSN 0033-2909.

SNYDER, A. Z.; RAICHLE, M. E. A brief history of the resting state: the Washington University perspective. **Neuroimage**, v. 62, n. 2, p. 902-10, Aug 15 2012. ISSN 1053-8119.

SNYDER, S. H.; BREDT, D. S. Nitric oxide as a neuronal messenger. **Trends Pharmacol Sci**, v. 12, n. 4, p. 125-8, Apr 1991. ISSN 0165-6147.

SONG, X.-W. et al. REST: A Toolkit for Resting-State Functional Magnetic Resonance Imaging Data Processing. **Plos One**, v. 6, n. 9, Sep 20 2011. ISSN 1932-6203.

SPRENG, R. N.; MAR, R. A.; KIM, A. S. The common neural basis of autobiographical memory, prospection, navigation, theory of mind, and the default mode: a quantitative meta-analysis. **J Cogn Neurosci**, v. 21, n. 3, p. 489-510, Mar 2009. ISSN 0898-929X.

STEIN, E. A. et al. Nicotine-induced limbic cortical activation in the human brain: a functional MRI study. **Am J Psychiatry**, v. 155, n. 8, p. 1009-15, Aug 1998. ISSN 0002-953X.

STEPHAN, K. E.; BALDEWEG, T.; FRISTON, K. J. Synaptic plasticity and disconnection in schizophrenia. **Biol Psychiatry**, v. 59, n. 10, p. 929-39, May 15 2006. ISSN 0006-3223.

STEPHAN, K. E.; FRISTON, K. J.; FRITH, C. D. Disconnection in schizophrenia: from abnormal synaptic plasticity to failures of self-monitoring. **Schizophr Bull**, v. 35, n. 3, p. 509-27, May 2009. ISSN 0586-7614.

SUR, C. et al. N-desmethylclozapine, an allosteric agonist at muscarinic 1 receptor, potentiates N-methyl-D-aspartate receptor activity. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 23, p. 13674-9, Nov 11 2003. ISSN 0027-8424.

SUSSER, E. S.; LIN, S. P. Schizophrenia after prenatal exposure to the Dutch Hunger Winter of 1944-1945. **Arch Gen Psychiatry**, v. 49, n. 12, p. 983-8, Dec 1992. ISSN 0003-990X.

TAKEI, N. et al. Relationship between in utero exposure to influenza epidemics and risk of schizophrenia in Denmark. **Biol Psychiatry**, v. 40, n. 9, p. 817-24, Nov 1 1996. ISSN 0006-3223.

TANAHASHI, S. et al. Clozapine, but not haloperidol, enhances glial D-serine and L-glutamate release in rat frontal cortex and primary cultured astrocytes. **Br J Pharmacol**, v. 165, n. 5, p. 1543-55, Mar 2012. ISSN 0007-1188.

TANDON, R. The nosology of schizophrenia: toward DSM-5 and ICD-11. **Psychiatr Clin North Am**, v. 35, n. 3, p. 557-69, Sep 2012. ISSN 0193-953x.

TANDON, R. et al. Definition and description of schizophrenia in the DSM-5. **Schizophr Res**, v. 150, n. 1, p. 3-10, Oct 2013. ISSN 1573-2509.

TANDON, R.; KESHAVAN, M. S.; NASRALLAH, H. A. Schizophrenia, "just the facts" what we know in 2008. 2. Epidemiology and etiology. **Schizophr Res**, v. 102, n. 1-3, p. 1-18, Jul 2008. ISSN 0920-9964.

TANDON, R.; MAJ, M. Nosological status and definition of schizophrenia: Some considerations for DSM-V and ICD-11. In: (Ed.). **Asian J Psychiatr**. Netherlands: Copyright (c) 2008 Elsevier B.V. All rights reserved., v.1, 2008. p.22-7. ISBN 1876-2018.

TANDON, R.; NASRALLAH, H. A.; KESHAVAN, M. S. Schizophrenia, "just the facts" 4. Clinical features and conceptualization. **Schizophr Res**, v. 110, n. 1-3, p. 1-23, May 2009. ISSN 0920-9964.

TANG, J. et al. Aberrant default mode functional connectivity in early onset schizophrenia. **PLoS One**, v. 8, n. 7, p. e71061, 2013. ISSN 1932-6203.

THOMAS, H. V. et al. Obstetric complications and risk of schizophrenia. Effect of gender, age at diagnosis and maternal history of psychosis. **Br J Psychiatry**, v. 179, p. 409-14, Nov 2001. ISSN 0007-1250.

TINKER, J. H.; MICHENFELDER, J. D. Sodium nitroprusside: pharmacology, toxicology and therapeutics. **Anesthesiology**, v. 45, n. 3, p. 340-352, 1976. ISSN 0003-3022.

TRACEY, I. Prospects for human pharmacological functional magnetic resonance imaging (phMRI). **J Clin Pharmacol**, v. Suppl, p. 21s-28s, Jul 2001. ISSN 0091-2700.

TSAI, G. E.; LIN, P. Y. Strategies to enhance N-methyl-D-aspartate receptor-mediated neurotransmission in schizophrenia, a critical review and meta-analysis. **Curr Pharm Des**, v. 16, n. 5, p. 522-37, 2010. ISSN 1381-6128.

TSUANG, M. T.; GILBERTSON, M. W.; FARAONE, S. V. The genetics of schizophrenia. Current knowledge and future directions. **Schizophr Res**, v. 4, n. 2, p. 157-71, Mar-Apr 1991. ISSN 0920-9964.

TUOMINEN, H. J.; TIIHONEN, J.; WAHLBECK, K. Glutamatergic drugs for schizophrenia: a systematic review and meta-analysis. **Schizophr Res**, v. 72, n. 2-3, p. 225-34, Jan 1 2005. ISSN 0920-9964.

UDDIN, L. Q. et al. Functional connectivity of default mode network components: correlation, anticorrelation, and causality. **Hum Brain Mapp**, v. 30, n. 2, p. 625-37, Feb 2009. ISSN 1065-9471.

VAN DEN HEUVEL, M. P.; HULSHOFF POL, H. E. Exploring the brain network: a review on resting-state fMRI functional connectivity. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 20, n. 8, p. 519-34, Aug 2010. ISSN 0924-977x.

VAN OS, J.; MARCELIS, M. The ecogenetics of schizophrenia: a review. **Schizophrenia research**, v. 32, n. 2, p. 127-135, 1998. ISSN 0920-9964.

VAN ROSSUM, J. M. The significance of dopamine-receptor blockade for the mechanism of action of neuroleptic drugs. **Arch Int Pharmacodyn Ther**, v. 160, n. 2, p. 492-4, Apr 1966. ISSN 0003-9780.

VEERMAN, S. R. et al. Clozapine augmented with glutamate modulators in refractory schizophrenia: a review and metaanalysis. **Pharmacopsychiatry**, v. 47, n. 6, p. 185-94, Sep 2014. ISSN 0176-3679.

VIDT, D. G.; GIFFORD, R. W. A compendium for the treatment of hypertensive emergencies. **Cleveland Clinic Quarterly**, v. 51, n. 2, p. 421-430, 1984. ISSN 0891-1150.

WADDINGTON, J. L. Schizophrenia: developmental neuroscience and pathobiology. **Lancet**, v. 341, n. 8844, p. 531-6, Feb 27 1993. ISSN 0140-6736.

WAHLBECK, K. et al. Evidence of clozapine's effectiveness in schizophrenia: a systematic review and meta-analysis of randomized trials. **Am J Psychiatry**, v. 156, n. 7, p. 990-9, Jul 1999. ISSN 0002-953X.

WEINBERGER, D. R. On the plausibility of "the neurodevelopmental hypothesis" of schizophrenia. **Neuropsychopharmacology**, v. 14, n. 3 Suppl, p. 1s-11s, Mar 1996. ISSN 0893-133X.

WEISSENBACHER, A. et al. Correlations and anticorrelations in resting-state functional connectivity MRI: A quantitative comparison of preprocessing strategies. **Neuroimage**, v. 47, n. 4, p. 1408-1416, Oct 1 2009. ISSN 1053-8119.

WENTHUR, C. J.; LINDSLEY, C. W. Classics in chemical neuroscience: clozapine. **ACS Chem Neurosci**, v. 4, n. 7, p. 1018-25, Jul 17 2013. ISSN 1948-7193.

WHITFIELD-GABRIELI, S.; FORD, J. M. Default mode network activity and connectivity in psychopathology. **Annu Rev Clin Psychol**, v. 8, p. 49-76, 2012. ISSN 1548-5943.

WHITFIELD-GABRIELI, S. et al. Hyperactivity and hyperconnectivity of the default network in schizophrenia and in first-degree relatives of persons with schizophrenia. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 4, p. 1279-84, Jan 27 2009. ISSN 0027-8424.

WINK, D. A. et al. Nitric oxide protects against cellular damage and cytotoxicity from reactive oxygen species. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 90, n. 21, p. 9813-7, Nov 1 1993. ISSN 0027-8424.

WISE, R. G.; PRESTON, C. What is the value of human FMRI in CNS drug development? **Drug Discov Today**, v. 15, n. 21-22, p. 973-80, Nov 2010. ISSN 1359-6446.

WOODWARD, N. D.; ROGERS, B.; HECKERS, S. Functional resting-state networks are differentially affected in schizophrenia. **Schizophr Res**, v. 130, n. 1-3, p. 86-93, Aug 2011.

YAMADA, K. et al. The role of nitric oxide in dizocilpine-induced impairment of spontaneous alternation behavior in mice. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 276, n. 2, p. 460-6, Feb 1996. ISSN 0022-3565.

ZHANG, F. et al. Evidence for progressive brain abnormalities in early schizophrenia: a cross-sectional structural and functional connectivity study. **Schizophr Res**, v. 159, n. 1, p. 31-5, Oct 2014. ISSN 1573-2509.

ZHOU, D.; THOMPSON, W. K.; SIEGLE, G. MATLAB toolbox for functional connectivity. **Neuroimage**, v. 47, n. 4, p. 1590-607, Oct 1 2009. ISSN 1053-8119.

ZHOU, Y. et al. Functional disintegration in paranoid schizophrenia using resting-state fMRI. **Schizophr Res**, v. 97, n. 1-3, p. 194-205, Dec 2007. ISSN 0920-9964.

ZIMMER, R. et al. Short- and long-term effects of GABA and dopamine neurons during treatment with sulpiride. **Adv Biochem Psychopharmacol**, v. 24, p. 537-9, 1980. ISSN 0065-2229.

ZINK, M.; CORRELL, C. U. Glutamatergic agents for schizophrenia: current evidence and perspectives. **Expert Rev Clin Pharmacol**, v. 8, n. 3, p. 335-52, May 2015. ISSN 1751-2433.

ZUARDI, A. W. et al. Estudo da estrutura fatorial, fidedignidade e validade da tradução e adaptação para o português da Escala de Avaliação Psiquiátrica Breve (BPRS) modificada. **Revista ABP-APAL**, 1994. ISSN 0102-7646.

ZWILLER, J. et al. Cyclic GMP in a neuroblastoma clone: possible involvement in morphological differentiation induced by dibutyryl cyclic AMP. **J Neurochem**, v. 29, n. 2, p. 273-8, Aug 1977. ISSN 0022-3042.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Voluntário portador de esquizofrenia

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

NOME DA PESQUISA: **Efeito do nitroprussiato de sódio em voluntários saudáveis e pacientes portadores de esquizofrenia: um estudo de ressonância magnética funcional.**

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Giovana Jorge Garcia

CRM-SP: 136.135

Endereço: Avenida Bandeirantes, 3900 Ribeirão Preto-SP CEP: 14049-900

Fone: (16) 3602-2430

Você está sendo convidado a participar de um estudo de pesquisa. Antes que você decida é importante que você entenda o porquê esta pesquisa está sendo feita e o que significa participar dela. É também muito importante que você saiba que o tratamento que você faz e as medicações que você vem tomando não serão mudados em nenhum momento por causa deste estudo de pesquisa. Suas informações pessoais também serão mantidas em sigilo. Caso você não aceite participar desse estudo, seu acompanhamento em nosso serviço continuará sendo o mesmo, sem nenhum prejuízo.

Por favor, leia atentamente as informações a seguir e discuta as mesmas com outras pessoas que você considere importantes e que possam lhe ajudar a decidir, se assim o desejar. Caso você tenha alguma dúvida durante a leitura, não se envergonhe em perguntar para que eu possa esclarecê-lo. Leve o tempo que for necessário para tomar sua decisão se irá participar ou não deste estudo.

01. Justificativa e objetivo da pesquisa:

Estudos prévios em seres humanos, realizados pela nossa equipe de pesquisa, mostraram que uma substância chamada nitroprussiato de sódio, utilizada há várias décadas de forma segura para tratar picos de pressão alta, pode melhorar sintomas presentes na Esquizofrenia. Além dos sintomas como ouvir vozes, ver vultos e acreditar em coisas que não estão acontecendo, essa medicação também mostrou melhora importante na interação do paciente com o ambiente, na

memória, na atenção e no comportamento. O presente estudo pretende avaliar a ação dessa medicação através de exames de imagem do cérebro.

02. Os procedimentos que serão utilizados e seu propósito, bem como a identificação dos procedimentos que são experimentais:

Caso concorde, você fará um exame chamado ressonância magnética funcional em uma data previamente agendada. Para fazer este exame será necessário instalar um soro na sua veia e será injetada a substância em estudo, chamada nitroprussiato de sódio, e também soro. Neste exame, você deverá permanecer deitado sem se movimentar por cerca de 35 minutos, para podermos avaliar o funcionamento de seu cérebro.

03. Desconfortos e riscos esperados:

Como qualquer injeção, o soro que será instalado em sua veia poderá lhe causar dor. A substância (nitroprussiato de sódio) que você receberá já foi estudada em outras pessoas e não proporcionou efeitos desagradáveis ou risco à vida. De qualquer forma, ao final dos exames verificaremos se você estará bem antes de o liberarmos para casa. Caso você sinta desconforto durante o exame, poderemos conversar sobre isso, e caso você continue a se sentir muito incomodado interromperemos o exame se você assim desejar. Você terá a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar no estudo sem que isso lhe traga qualquer prejuízo. Caso você se interesse, os resultados dos seus exames e da pesquisa serão fornecidos, assim que disponíveis.

04. Benefícios que se pode obter:

O esclarecimento de como o nitroprussiato de sódio age no cérebro, e se é capaz de reduzir sintomas em pessoas com diagnóstico semelhante ao seu (Esquizofrenia), poderão aumentar o nosso entendimento dos seus potenciais efeitos terapêuticos e fornecer uma base científica para novas aplicações médicas da droga.

PESQUISADOR: _____

Eu _____, R.G. _____, abaixo assinado, tendo recebido as informações acima, e ciente dos meus direitos abaixo relacionados, concordo em participar.

1. A garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros relacionados com a pesquisa e o tratamento a que serei submetido;

2. A liberdade de retirar meu consentimento a qualquer momento e deixar de participar no estudo sem que isso traga prejuízo à continuidade do meu cuidado e tratamento;

3. A segurança de que não serei identificado e que será mantido o caráter confidencial da informação relacionada com a minha privacidade;

4. O compromisso de me proporcionar informação atualizada durante o estudo, ainda que esta possa afetar minha vontade de continuar participando;

5. A disponibilidade de tratamento médico e a indenização que legalmente teria direito, por parte da Instituição à saúde, em caso de danos que a justifiquem, diretamente causados pela pesquisa e;

6. Que se existirem gastos adicionais estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.

Tenho ciência do exposto acima e desejo utilizar o produto como método terapêutico recomendado pelo médico que subscreve este documento.

Ribeirão Preto, _____ de _____ de _____

ASSINATURA DO PACIENTE E DO FAMILIAR (OU RESPONSÁVEL LEGAL)

Voluntário saudável

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

NOME DA PESQUISA: Efeito do nitroprussiato de sódio em voluntários saudáveis e pacientes portadores de esquizofrenia: Um estudo de ressonância magnética funcional.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Giovana Jorge Garcia

CRM-SP: 136.135

Endereço: Avenida Bandeirantes, 3900 Ribeirão Preto-SP CEP: 14049-900

Fone: (16) 3602-2430

Você está sendo convidado a participar de um estudo de pesquisa. Antes que você decida é importante que você entenda o porquê esta pesquisa está sendo feita e o que significa participar dela. É importante ressaltar que suas informações pessoais serão mantidas em sigilo. Por favor, leia atentamente as informações a seguir e discuta as mesmas com outras pessoas que você considere importantes e que possam lhe ajudar a decidir, se assim o desejar. Caso você tenha alguma dúvida durante a leitura, não se envergonhe em perguntar para que eu possa esclarecê-lo. Leve o tempo que for necessário para tomar sua decisão se irá participar ou não deste estudo.

01. Justificativa e objetivo da pesquisa:

Estudos prévios em seres humanos, realizados pela nossa equipe de pesquisa, mostraram que uma substância chamada nitroprussiato de sódio, utilizada há várias décadas de forma segura para tratar picos de pressão alta, pode melhorar sintomas presentes na Esquizofrenia. Além dos sintomas como ouvir vozes, ver vultos e acreditar em coisas que não estão acontecendo, essa medicação também mostrou melhora importante na interação do paciente com o ambiente, na memória, na atenção e no comportamento. O presente estudo pretende avaliar a ação dessa medicação através de exames de imagem do cérebro.

02. Os procedimentos que serão utilizados e seu propósito, bem como a identificação dos procedimentos que são experimentais:

Caso concorde, você fará um exame chamado ressonância magnética funcional em uma data previamente agendada. Para fazer este exame será necessário instalar um soro na sua

veia e será injetada a substância em estudo, chamada nitroprussiato de sódio, e também soro. Neste exame, você deverá permanecer deitado sem se movimentar por cerca de 35 minutos, para podermos avaliar o funcionamento de seu cérebro.

03. Desconfortos e riscos esperados:

Como qualquer injeção, o soro que será instalado em sua veia poderá lhe causar dor. A substância (nitroprussiato de sódio) que você receberá já foi estudada em outras pessoas e não proporcionou efeitos desagradáveis ou risco à vida. De qualquer forma, ao final dos exames verificaremos se você estará bem antes de o liberarmos para casa. Caso você sinta desconforto durante o exame, poderemos conversar sobre isso, e caso você continue a se sentir muito incomodado interromperemos o exame se você assim desejar. Você terá a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar no estudo sem que isso lhe traga qualquer prejuízo. Caso você se interesse, os resultados dos seus exames e da pesquisa serão fornecidos, assim que disponíveis.

04. Benefícios que se pode obter:

O esclarecimento de como o nitroprussiato de sódio age no cérebro, e se é capaz de reduzir sintomas em pessoas com esquizofrenia, poderão aumentar o nosso entendimento dos seus potenciais efeitos terapêuticos e fornecer uma base científica para novas aplicações médicas da droga.

PESQUISADOR: _____

Eu _____, R.G. _____, abaixo assinado, tendo recebido as informações acima, e ciente dos meus direitos abaixo relacionados, concordo em participar.

1. A garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros relacionados com a pesquisa e o tratamento a que serei submetido;

2. A liberdade de retirar meu consentimento a qualquer momento e deixar de participar no estudo sem que isso traga prejuízo à continuidade do meu cuidado e tratamento;

3. A segurança de que não serei identificado e que será mantido o caráter confidencial da informação relacionada com a minha privacidade;

4. O compromisso de me proporcionar informação atualizada durante o estudo, ainda que esta possa afetar minha vontade de continuar participando;

5. A disponibilidade de tratamento médico e a indenização que legalmente teria direito, por parte da Instituição à saúde, em caso de danos que a justifiquem, diretamente causados pela pesquisa e;

6. Que se existirem gastos adicionais estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.

Tenho ciência do exposto acima e desejo utilizar o produto como método de pesquisa orientado pelo médico que subscreve este documento.

Ribeirão Preto, _____ de _____ de _____

ASSINATURA DO VOLUNTÁRIO

APÊNDICE B

Revista Brasileira de Psiquiatria. 2015;37:71–79
 © 2015 Associação Brasileira de Psiquiatria
 doi:10.1590/1516-4446-2014-1387

REVIEW ARTICLE

Structural and functional neuroimaging findings associated with the use of clozapine in schizophrenia: a systematic review

Giovana J. Garcia,¹ Marcos H. Chagas,¹ Carlos H. Silva,¹ João P. Machado-de-Sousa,^{1,2} José A. Crippa,^{1,2} Jaime E. Hallak^{1,2}

¹Department of Neuroscience and Behavior, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brazil. ²National Science and Technology Institute for Translational Medicine (INCT-TM), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil.

Objective: Schizophrenia is one of the most severe psychiatric disorders, and its current treatment relies on antipsychotic medications with only partial effectiveness. Clozapine is an atypical antipsychotic with a specific profile of action indicated for treatment-resistant schizophrenia. Neuroimaging studies assessing the effects of clozapine could help shed light on the neural underpinnings of the effects of this drug in the brain. The objective of this study was to review the available literature on the structural and functional neuroimaging findings associated with use of clozapine.

Method: We conducted a systematic review of the indexed literature using the PubMed, BIREME, and ISI Web of Knowledge search engines and the following keywords: clozapine, neuroimaging, computed tomography, MRI, functional magnetic resonance, PET, SPECT, and DTI.

Results: A total of 23 articles were included in the review. In structural studies, the use of clozapine was associated with volume reductions in the basal ganglia, especially the caudate nucleus, where functional neuroimaging studies also found decreased perfusion. In the frontal lobe, clozapine treatment was associated with increased gray matter volume and reduced perfusion.

Conclusion: The results of the studies reviewed suggest that the use of clozapine is associated with distinctive structural and functional neuroimaging findings that are not shared with other antipsychotics.

Keywords: Clozapine; neuroimaging; schizophrenia; magnetic resonance; computed tomography

Introduction

Schizophrenia is a chronic and often disabling disorder that affects about 1% of the world population, with no significant differences between countries, cultures, or gender, and poses an important challenge to clinical psychiatry.^{1,2} In general, onset occurs in late adolescence and early adulthood, causing severe impairment to the personal, social, and occupational functioning of patients, affecting their productivity, and generating high costs to health systems. Schizophrenia has a heterogeneous presentation and different psychopathological dimensions, classified as positive, negative, disorganized, affective, and cognitive domains, the expression of which varies across individuals and over the course of the disease.³

Despite numerous studies aimed at understanding the disorder, its etiology and pathophysiology are still

unknown, and available treatments are only partially effective.⁴ Evidence suggests that schizophrenia is the result of the interaction of genetic, environmental, and social aspects, and most researchers view it as a neurodevelopmental disorder.⁵⁻⁷

Antipsychotic drugs are the main treatment for schizophrenia, and are classified as typical or atypical according to their profile of action and extrapyramidal side effects. These medications are of the utmost importance in reducing psychotic symptoms and preventing relapse.⁸ However, in contrast with their clear effects on psychotic symptoms, antipsychotics have modest effects on negative symptoms and cognitive impairment.²

Clozapine, the first atypical antipsychotic, represents the main advance in the pharmacological treatment of schizophrenia since the introduction of antipsychotics in clinical practice in the 1950s. It has unique potential for treatment of refractory positive symptoms, negative symptoms, suicidal risk, and cognitive functioning without triggering extrapyramidal symptoms,⁹⁻¹¹ with the important drawback of its potential to cause agranulocytosis. Due to its superior efficacy profile, clozapine has been investigated for a better understanding of its effects on the central nervous system in the search for novel, more efficient antipsychotic drugs.¹²

Correspondence: Jaime Eduardo Cecilio Hallak, Department of Neuroscience and Behavior, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP), Av. Bandeirantes, 3900, CEP: 14048-900, Ribeirão Preto, SP, Brazil.
 E-mail: jhallak@fmrp.usp.br
 Submitted Feb 10 2014, accepted May 02 2014.

Major technical advances in imaging techniques achieved in recent decades have enabled the *in vivo* study of patients with schizophrenia, and become an important tool to investigate its pathophysiological mechanisms. Recent developments in this area have also vastly expanded our knowledge of the effects of pharmacological compounds in the brain and their action on the central nervous system without the use of invasive methods.¹³

The objective of this study was to review available data on the structural and functional correlates of the use of clozapine in schizophrenia, assessed through neuroimaging techniques, namely computed tomography (CT), structural (MRI) and functional (fMRI) magnetic resonance imaging, magnetic resonance spectroscopy (MRS), single-photon emission computed tomography (SPECT), positron emission tomography (PET), and diffusion tensor imaging (DTI).

Method

The article search and selection process was based on the PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses) statement. We searched

for articles indexed in the PubMed, BIREME, and ISI Web of Knowledge electronic databases using the following search terms and their equivalents in Portuguese: clozapine AND (neuroimaging OR computed tomography OR MRI OR functional magnetic resonance OR PET OR SPECT OR DTI), published until December 2012. References of selected articles were also hand-searched for possible additional citations.

To be included in the review, studies had to meet the following criteria: 1) involve only human samples; 2) be an original article published in English, Portuguese, or Spanish; and 3) describe brain structural and/or functional features associated with the use of clozapine in schizophrenia. Exclusion criteria were: 1) case reports, literature reviews, or letters to the editor; 2) studies that did not use clozapine; 3) reports on the side effects of clozapine or about its effects on organs other than the brain; 4) studies that did not use neuroimaging techniques; 5) investigations on the use of clozapine in other psychiatric and/or neurological disorders; 6) analyses of previous structural and functional changes predicting response to clozapine; and 7) studies assessing only receptor occupancy.

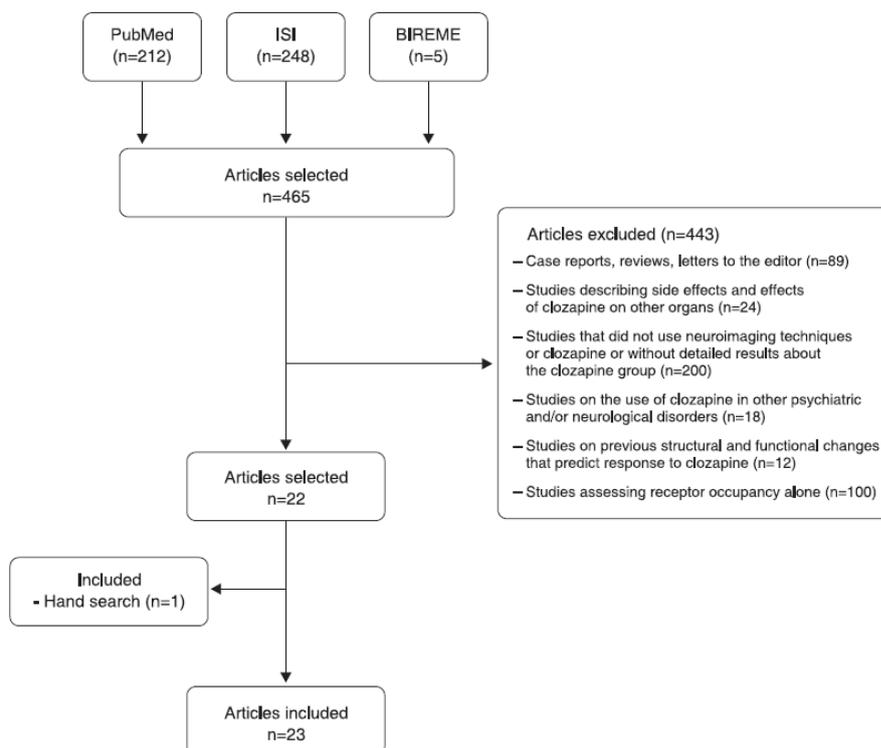


Figure 1 Flowchart of the article search and selection procedure for the systematic review.

The article search and selection process and reasons for the exclusion of references are shown in Figure 1.

Results

Of the 23 articles examined in this review, 15 included healthy control groups for comparison. Regarding experimental samples, eight studies included only patients treated with clozapine and 15 involved patients on other antipsychotics in addition to participants on clozapine.

For heuristic purposes, the included studies were divided into "structural" and "functional" according to the neuroimaging technique used. Seven studies used structural MRI and the remaining 16 used functional neuroimaging techniques (two used fMRI, three used MRS, five used SPECT, and seven used PET). One of the functional studies used two techniques: spectroscopy and SPECT.

Structural studies

Studies evaluating the effects of clozapine by means of MRI are described in Table 1. The interval between MRI scans before and after clozapine initiation ranged from 24 weeks to 5 years. Of the seven MRI studies included, six described the use of typical antipsychotics prior to clozapine. Clozapine was the only medication used by patients during image acquisition in three studies, while the remaining four also included patients on other antipsychotics. Four studies in this group assessed basal ganglia volume, mainly focusing on the caudate nucleus,

and the three remaining studies assessed white and gray matter volumes, white and gray matter density, and gray matter cortical thickness respectively.

In comparison with typical antipsychotic therapy, clozapine treatment was associated with volume reductions in the caudate nucleus in all studies assessing this region. Regarding white and gray matter volume, Molina et al.¹⁸ found increased gray matter volume and reduced white matter volume after comparing a group on clozapine treatment and a healthy control group, with changes observed in total, frontal, parietal, and occipital volumes in comparison with controls.¹⁸ Van Haren et al.¹⁹ investigated white and gray matter density in a longitudinal study and reported that the dose of clozapine accumulated per year during the 5-year follow-up study was related to a smaller reduction in density in the region of the left superior frontal gyrus compared with typical antipsychotic therapy. In a study comparing patients on clozapine and olanzapine, another atypical antipsychotic, Mattai et al.²⁰ assessed gray matter cortical thickness and found the use of clozapine to be associated with thickness reduction in an area of the right prefrontal cortex.

Functional studies

The included functional studies were divided in accordance with the neuroimaging technique used.

Functional magnetic resonance (fMRI)

The two fMRI studies assessing the effects of clozapine in the central nervous system are described in Table 2.

Table 1 Structural findings associated with the use of clozapine as assessed by MRI

Reference	Sample	Medication	Duration	Region assessed	Variable investigated	Talairach coordinates (x, y, z)	Results
Chakos ¹⁴	15 patients	CLZ (8) Typical AP (7) Previous typical AP (8)	54.6 weeks	Caudate nucleus	Volume	N/A	↓ caudate nucleus volume in CLZ group
Frazier ¹⁵	8 patients 8 controls	CLZ Previous typical AP	2 years	Basal ganglia Lateral ventricles	Volume	N/A	↓ caudate nucleus volume
Scheepers ¹⁶	26 patients	CLZ Previous typical AP	24 weeks	Caudate nucleus	Volume	N/A	↓ caudate nucleus volume
Scheepers ¹⁷	28 patients	CLZ Previous typical AP	52 weeks	Caudate nucleus	Volume	N/A	↓ right caudate nucleus volume in patients who responded to CLZ
Molina ¹⁸	29 patients 11 controls	RSP (17) CLZ (12) Previous typical AP	26 months	WM/GM: total, frontal, parietal, temporal and occipital	Volume	N/A	↑ total, frontal, parietal, occipital GM volume and ↓ total, frontal, parietal and occipital WM volume in CLZ vs. control group
Van Haren ¹⁹	96 patients 113 controls	CLZ Typical AP Atypical AP Previous typical/atypical AP	5 years	WM and GM	Density	(-7, 58, 25)	Accumulated dose/years of CLZ and OLZ related to a smaller ↓ of density in superior left frontal gyrus
Mattai ²⁰	24 patients 44 controls	CLZ (12) OLZ (12) Unspecified previous treatment	6 years	GM	Cortical thickness	N/A	Small area in the right prefrontal cortex thinner in the CLZ vs. OLZ group

AP = antipsychotic; CLZ = clozapine; GM = gray matter; MRI = magnetic resonance imaging; N/A = not available; OLZ = olanzapine; RSP = risperidone; WM = white matter; ↑ = increase; ↓ = decrease.

Both studies used single scans and tasks simultaneous to image acquisition. Wenz et al.²¹ compared patients taking clozapine with healthy controls during a motor task to assess the sensorimotor cortex. A substantial reduction in motor activation signal was found in patients taking clozapine in comparison with controls, especially in association with left hand movements.²¹

Besides patients on clozapine and healthy controls, Schmitt et al.²² also assessed patients using typical antipsychotics during visual and auditory stimulation tasks, with the objective of assessing prefrontal and parietal areas and the anterior cingulate gyrus. In this study, clozapine was associated with greater activation in these areas in comparison with atypical antipsychotics.

None of these studies provided specific information concerning the use of typical antipsychotics prior to clozapine.

Magnetic resonance spectroscopy (MRS)

Three studies assessed the effects of clozapine on the central nervous system through MR proton spectroscopy (Table 3). Two of these investigations included groups of patients on typical and other atypical antipsychotics and healthy control groups to be compared with patients on clozapine in a single scan. The remaining study was a longitudinal investigation of a group of patients without medication (baseline) and after 8 weeks of clozapine treatment. All patients taking clozapine in these studies had been previously treated with typical antipsychotics. The brain areas assessed using MRS were the left frontal lobe, left temporal lobe, caudate nucleus, left thalamus, and left dorsolateral prefrontal cortex (LDLPFC). Metabolites measured with MRS included N-acetylaspartate (NAA), choline, and creatine, but the use of clozapine was not associated with any significant changes in their levels.

Positron emission tomography (PET) and single-photon emission computed tomography (SPECT)

The functional neuroimaging studies that used PET and SPECT (n=12) are listed respectively in Tables 4 and 5. Of all studies included in this group, nine were longitudinal studies. Six of the studies in this category used tasks during image acquisition protocols and six recorded activity at rest. The use of typical antipsychotics prior to clozapine was reported in eight articles. Four of the

studies included only samples of patients on clozapine, whereas the remaining eight included groups using other typical and/or atypical antipsychotics.

Six articles described reduced frontal lobe perfusion with the use of clozapine, especially in prefrontal areas.^{26,28,31,32,35,36} Three of these were longitudinal studies in which the first scan was obtained while patients were on treatment with typical antipsychotics^{26,35} or atypical antipsychotics²⁸ and the second scan was performed after a period of treatment with clozapine. Cohen et al.³² described reduced frontal lobe perfusion with the use of clozapine in comparison with controls, and Molina et al.³⁶ found similar results comparing a group on clozapine with neuroleptic-naïve patients and controls.^{32,36} Lastly, Cohen et al.³¹ also found reduced frontal lobe perfusion in patients on clozapine compared with patients on fluphenazine and controls.³¹

Conversely, one study found significantly increased perfusion in regions of the frontal lobe comparing patients without medication and the same group of patients 8 weeks after the initiation of clozapine treatment.²⁵ Clozapine treatment was also associated with increased cerebral blood flow (CBF) in the dorsolateral prefrontal cortex and reduced CBF in the ventrolateral frontal cortex in comparison with haloperidol treatment and untreated controls.³³

A pattern of decreased activation in the region of the basal ganglia in association with the use of clozapine was found in four studies.^{26,28,35,36} Two of these compared patients on clozapine and patients on typical antipsychotics,^{26,35} one compared patients on clozapine and risperidone,²⁸ and the last one compared a group of patients on clozapine with neuroleptic-naïve patients and healthy controls.³⁶

Increased perfusion in regions of the temporal, occipital, and parietal cortices was reported in five studies.^{28,31-33,35} Two of the studies found increased perfusion in the occipital cortex of patients on clozapine compared with haloperidol treatment.^{33,35}

Molina et al.²⁸ reported increased posterior temporal and occipital cortex perfusion in patients treated with clozapine compared with controls, in addition to increased perfusion in the medial occipital cortex in clozapine patients compared with risperidone patients.²⁸ Finally, Cohen et al.³² described increased perfusion in the occipital and parietal cortices when comparing patients treated with clozapine and healthy controls.³²

Table 2 Functional findings associated with the use of clozapine as assessed by fMRI

Reference	Sample	Medication	Duration/task	Region assessed	Talairach coordinates (x, y, z)	Results
Wenz ²¹	14 patients 10 controls	CLZ	Single scan Motor task	Sensorimotor cortex	N/A	↓ motor activation in comparison with controls, more noticeably in the left hand
Schmitt ²²	18 patients 21 controls	CLZ (9) Typical AP (9)	Single scan visual/auditory stimulus	Prefrontal and parietal cortices and anterior cingulum gyrus	(36, 14, 44) (39, -59, 44) (-12, 20, 46) (6, 31, 40)	↑ activation in pre-frontal dorsolateral, posterior parietal and anterior cingulate cortices vs. typical AP

AP = antipsychotic; CLZ = clozapine; fMRI = functional magnetic resonance imaging; N/A = not available; ↑ = increase; ↓ = decrease.

Table 3 Findings associated with the use of clozapine as assessed by MRS

Reference	Sample	Medication	Duration	Region assessed	Talairach coordinates (x, y, z)	Results
Bustillo ²³	38 patients 21 controls	CLZ (19) HLP (19) Previous typical AP	Single scan	Caudate nucleus left frontal lobe	N/A	No differences among groups in CSF-corrected NAA ↓ NAA in left frontal lobe in HLP vs. control group
Szulc ²⁴	58 patients 21 controls	CLZ (10) Atypical AP (38) Typical AP (10) Previous typical AP	Single scan	Left frontal and left temporal lobes and left thalamus	N/A	No differences in NAA between the atypical APs analyzed together and separately (CLZ, OLZ, RSP) vs. controls and typical APs ↓ NAA in thalamus of typical AP vs. control group participants
Ertugrul ²⁵	22 patients	CLZ Previous typical and atypical AP	8 weeks	Left DLPFC	N/A	Trend toward ↑ NAA/Cre in left DLPFC region

AP = antipsychotics; CLZ = clozapine; Cre = creatine; CSF = cerebrospinal fluid; DLPFC = dorsolateral prefrontal cortex; HLP = haloperidol; MRS = magnetic resonance spectroscopy; NAA = N-acetylaspartate; N/A = not available; OLZ = olanzapine; RSP = risperidone; ↑ = increase; ↓ = decrease.

Discussion

We reviewed empirical articles dealing with the structural and functional correlates of the use of clozapine in schizophrenia assessed through neuroimaging techniques. Taken together, the results of these studies suggest that clozapine treatment may be associated with changes in the structure and activity of specific brain areas, mainly the basal ganglia and frontal cortex.

The area of the basal ganglia, especially the caudate nucleus, was shown to develop volume reductions associated with the use of clozapine in structural studies, in addition to decreased perfusion in functional studies. This may reflect the weak antagonism of clozapine on D2 receptors, which are abundant in this region, and its significant action on D3 and D4 receptors. This profile of action may cause a down-regulation of D2 receptors and consequent volumetric and metabolic reductions in a given brain region.³⁷ The previous use and discontinuation of typical antipsychotics could be implicated in such findings, since their strong antagonist action on D2 receptors could stimulate upregulation of these receptors, as well as cause volume and perfusion increases.

Accordingly, the discontinuation of these medications could lead to reductions in volume and activity that could be mixed with the effects of clozapine introduction.³⁸

Regarding gray matter, the results available suggest that clozapine may have a neuroprotective effect, as suggested by descriptions of increased gray matter volume and decreased loss of density in the left frontal gyrus in the articles reviewed. Previous studies using olanzapine, which is an atypical antipsychotic similar to clozapine, showed an increase in glial cell division and cortical hypertrophy in rats.³⁹ Such effects of clozapine may also explain its action on gray matter.

Another possibility is that the use of typical antipsychotics such as haloperidol has been associated with progressive loss of gray matter.⁴⁰ Therefore, the previous use of typical antipsychotics and their subsequent

discontinuation could be involved in the increase of volume and density of gray matter.

The frontal lobe, and mainly its prefrontal portion, has been assessed in many functional studies included in this review because of its likely involvement in the etiology and pathophysiology of schizophrenia. Half of the studies that used SPECT and PET described reduced activity in frontal regions. Clozapine increases extracellular dopamine in frontal areas, and this increase stimulates the release of GABA, an inhibitor that reduces perfusion in the region.^{41,42} The fact that clozapine blocks D1 receptors more efficiently than D2 receptors may also be involved in the metabolic patterns observed.⁴³ D1 receptors are densely distributed in the prefrontal cortex, and clozapine-induced D1 blockade could contribute to lower prefrontal activity. Clozapine has also been found to reduce prefrontal hyperfunction in patients with schizophrenia during task performance.²⁸

The increase in cortical activity in the parietal and temporal cortices and, mainly, in the occipital cortex observed with the use of clozapine may be a result of the tendency of atypical antipsychotics to increase cortical perfusion.⁴⁴ However, it may also be a consequence of the discontinuation of previous therapy with typical antipsychotics, the use of which has been associated with decreased cortical activity. In general, however, patients taking clozapine showed greater activation in the cortical regions assessed when compared with patients using typical antipsychotics. This can probably be explained by an improvement in glutamatergic transmission caused by clozapine, which is supported by findings from animal studies that show an increase in the activity of NMDA glutamate receptors with clozapine treatment that did not occur with the administration of haloperidol.^{45,46} Therefore, typical antipsychotics seem unable to counteract glutamatergic hypofunction in schizophrenia.

Levels of NAA, a marker of neuronal integrity assessed through spectroscopy, were found to be reduced in prefrontal and temporal regions in schizophrenia.^{23,47} The absence of significant differences in NAA levels

Table 4 Functional findings associated with the use of clozapine as assessed by SPECT

Reference	Sample	Medication	Tests	Duration	Region assessed	Talairach coordinates (x, y, z)	Results
Rodriguez ²⁶	39 patients 28 controls	CLZ Typical AP Previous typical AP	SPECT: Tc-99m ECD HMPAO	26 weeks	Thalamus, basal ganglia, superior/inferior DLPFC, and anterior prefrontal cortex	N/A	↓ perfusion in thalamus, basal ganglia, superior left DLPFC and anterior PFC in CLZ (17) vs. typical AP responders
Zhao ²⁷	21 patients 40 controls	CLZ Unspecified previous treatment	SPECT: Tc-99m ECD WCST	8 weeks	Frontal, temporal, parietal, and occipital lobes Cerebellum	N/A	Smaller % of ↑ with activation condition in frontal lobe before and after CLZ vs. controls No ↑ in RS perfusion
Molina ²⁸	10 patients 10 controls	RSP CLZ Previous typical and/or atypical AP	SPECT: Tc-99m HMPAO Stroop test	8 weeks	Cerebral activation pattern	(-4, 56, 32) (46, -74, 32) (54, -42, -12) (-12, -54, 36) (-8, 8, 2) (4, -22, 54) (30, 8, -20) (2, -40, -18)	CLZ: ↓ medial PFC and ↑ posterior temporal, occipital and brain stem vs. controls ↓ perfusion in posterior cingulate and hippocampus and ↑ medial occipital cortex and head of the caudate in responders vs. RSP
Ertugru ²⁵	22 patients	CLZ Previous typical and/or atypical AP	SPECT: Tc-99m HMPAO	8 weeks	Frontal, parietal, temporal, and occipital lobes Caudate, thalamus, cerebellum	(-71, 10, 4) (-71, -8, 16) (-71, 10, 35) (-71, 10, 55)	↑ perfusion in left and right frontal (superior and medial)/caudate in CLZ responders
Ergun ²⁹	20 patients	CLZ Previous typical and/or atypical AP	SPECT Tc-99m HMPAO SISCOM	8 weeks	Cortical, subcortical, cerebellar	N/A	Alteration in perfusion, mainly in the frontal cortex and basal ganglia

AP = antipsychotic; CLZ = clozapine; DLPFC = dorsolateral prefrontal cortex; ECD = ethyl cysteinatate dimer; HMPAO = hexamethylpropyleneamine oxime; N/A = not available; PFC = prefrontal cortex; RS = resting state; RSP = risperidone; SISCOM = subtraction ictal SPECT coregistered to MRI; SPECT = single photon emission tomography; Tc = technetium; WCST = Wisconsin Card Sorting Test; ↑ = increase; ↓ = decrease.

across the groups evaluated in the studies may suggest a normalization of this marker with the use of clozapine.²⁴ Previous use of typical antipsychotics should also be considered as a possible explanation, since this class of antipsychotics has been associated with lower NAA levels in the thalamus and frontal lobe of patients compared to controls.^{23,24}

The structural and functional changes associated with clozapine treatment found in this review are different from those previously associated with typical antipsychotics and, albeit smaller, from those described in association with the use of other atypical antipsychotics. A consistent finding of MRI studies is that typical antipsychotics are associated with enlargement of the basal ganglia and reductions in cortical volume, mainly in the frontal and temporal lobes, while atypical antipsychotics seem to be mostly associated with enlargement of the thalamus.⁴⁸⁻⁵⁰ Spectroscopy studies have described reduced NAA levels in frontal areas in patients treated with typical antipsychotics compared to patients on atypical antipsychotics.^{51,52} In addition, typical antipsychotics seem to reduce activity in the frontal cortex and increase activity in the basal ganglia, while atypical antipsychotics appear to be associated with decreased activity in frontal areas.^{44,53,54}

Some limitations of our review must be mentioned. First, the previous use of typical antipsychotics reported

in most studies and the time of withdrawal varying widely from a few days to months could act as confounding factors in the interpretation of the results presented. These drugs can cause specific structural and functional changes of unknown intensity, direction, and course after the discontinuation of use. Further investigation is necessary to accurately determine whether the changes reported in the articles and summarized here are due to the introduction of clozapine or to the discontinuation of typical antipsychotics. Another limitation is that the dose and time of clozapine treatment in the different samples varied significantly, making comparisons more difficult. Another factor possibly affecting results is that most of the subjects enrolled in the studies were diagnosed with refractory schizophrenia, which, due to its severity and poor prognosis, can cause changes in the central nervous system. The heterogeneity in study designs and number of scans performed should also be considered as obstacles to global analyses and imaging comparisons. Finally, the lack of control groups of either healthy subjects or patients on antipsychotics other than clozapine is another factor that hinders the comparison of results.

An important point to be noted in our review was the inclusion of articles describing studies with the same sample or similar samples whose results were analyzed and presented separately. Molina et al.³⁵ and Molina

Table 5 Functional findings associated with the use of clozapine as assessed by PET

Reference	Sample	Medication	Tests	Duration	Region assessed	Talairach coordinates (x, y, z)	Results
Buchsbaum ³⁰	12 patients	CLZ (7) TTX (5)	18F-FDG-PET Continuous Performance Task	28-49 days	Basal ganglia	N/A	CLZ: ↑ metabolism in basal ganglia vs. TTX
Cohen ³¹	43 patients 41 controls	FLZ (22) CLZ (11)	18F-FDG-PET Auditory Discrimination Task	Single scan	Superior and inferior PFC, occipital, parietal, temporal lateral, limbic, and subcortex	N/A	CLZ: ↓ metabolism in the PFC vs. controls and FLZ ↑ metabolism of limbic, parietal, and occipital cortices vs. controls CLZ: ↓ in superior and inferior PFC and ↑ in the occipital and parietal vs. controls
Cohen ³²	52 patients 81 controls	FLZ (28) CLZ (24)	18F-FDG-PET Auditory Discrimination Task	Single scan		N/A	↑ ↑ effect in the temporal medial cortex ↑ ↑ of perfusion in right ventral striatum, left caudate, and left DLPFC vs. controls
Lahti ³³	6 patients	HLP (5) CLZ (after) (5) Previous typical AP	PET ¹⁵ O water	35 weeks	Cerebral activation pattern	(32, 4, -12) (-14, 8, 16) (-50, -8, 26) (-26, 16, 36) (-30, -28, -10) (50, 34, -4) (-44, 34, -6)	↑ in anterior cingulate, medial frontal cortex, DLFC, and occipital cortex vs. HLP ↓ in left hippocampus and VLFC vs. controls ↓ ventral striatum, putamen, right VLFC vs. HLP CLZ with similar perfusion to controls
Lahti ³⁴	6 patients 12 controls	HLP (5) CLZ (after) (5) Previous typical AP	PET ¹⁵ O water	35 weeks	Anterior cingulate gyrus	(-2, 12, 48)	
Molina ³⁵	22 patients	HLP CLZ Previous typical AP	18F-FDG-PET	6 months	Cerebral activation pattern	(30, 58, 32) (-34, 52, 34) (-6, 54, 40), (-30, -12, 2) (26, 4, 2) (34, -78, 4) (-30, -82, 20) (52, 22, 34) (2, 52, -4)	CLZ: ↓ in DLPFC, medial prefrontal and left inferior medial temporal cortex, and basal ganglia vs. HLP ↑ in occipital vs. HLP
Molina ³⁶	40 patients 18 controls	CLZ (23) Previous typical and atypical AP NN (17)	18F-FDG-PET	Single scan	Cerebral activation pattern	(2, 36, 16) (-40, 18, 0) (42, 20, -2) (-6, 14, -6) (44, 26, 42) (-26, 38, -8) (2, 54, -6), (-4, 44, 40)	CLZ: ↓ in dorsolateral cortex, orbito-frontal, insular, and anterior cingulate vs. controls and NN

AP = antipsychotic; CLZ = clozapine; DLFC = dorsolateral frontal cortex; DLPFC = dorsolateral prefrontal cortex; FLZ = fluphenazine; HLP = haloperidol; N/A = not available; NN = neuroleptic-naive; PET = positron emission tomography; PFC = prefrontal cortex; TTX = tiotixene; VLFC = ventrolateral frontal cortex; 18F-FDG = (18F)fluoro-2-deoxyglucose; ↑ = increase; ↓ = decrease.

et al.³⁶ worked with the same sample of treatment-resistant patients that were taking clozapine; however, the most recent publication included and compared a group of treatment-naive patients. Both studies found reduced frontal lobe perfusion with the use of clozapine. Cohen et al.³² worked with the same sample of Cohen et al.³¹ but included more subjects and found similar results. The two articles by Scheepers et al.^{16,17} analyzed the same sample of patients, but with different durations of clozapine treatment. Both articles described volume reductions in the caudate nucleus. Finally, Lahti et al.³³ and Lahti et al.³⁴ also worked with the same sample, but investigated different brain areas in each article. If, on the one hand, studies with the same sample can be expected to reach the same conclusions, the inclusion of additional analyses and comparisons may lend strength to their findings.

Available evidence from neuroimaging investigations suggests that clozapine may have a specific profile of action on the central nervous system when compared with typical and other atypical antipsychotics, particularly in the prefrontal area of the frontal lobe and in the basal ganglia. Determination of the neural basis of the effects of clozapine in the brain may provide clues into the still-unknown etiology of schizophrenia and inform the development of novel, better medications to treat psychosis.

Acknowledgements

JEH and JAC are recipients of research fellowship awards from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). JPMS receives a post-doctoral grant from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Disclosure

The authors report no conflicts of interest.

References

- Mueser KT, McGurk SR. Schizophrenia. *Lancet*. 2004;363:2063-72.
- Insel TR. Rethinking schizophrenia. *Nature*. 2010;468:187-93.
- Tandon R, Nasrallah HA, Keshavan MS. Schizophrenia, "just the facts" 4. Clinical features and conceptualization. *Schizophr Res*. 2009;110:1-23.
- Tandon R, Keshavan MS, Nasrallah HA. Schizophrenia, "Just the Facts": what we know in 2008 part 1: overview. *Schizophr Res*. 2008;100:4-19.
- Lewis DA, Levitt P. Schizophrenia as a disorder of neurodevelopment. *Annu Rev Neurosci*. 2002;25:409-32.
- Pilowsky LS, Kerwin RW, Murray RM. Schizophrenia: a neurodevelopmental perspective. *Neuropsychopharmacology*. 1993;9:83-91.
- Waddington JL. Schizophrenia: developmental neuroscience and pathobiology. *Lancet*. 1993;341:531-6.
- Kane JM, Marder SR. Psychopharmacologic treatment of schizophrenia. *Schizophr Bull*. 1993;19:287-302.
- Buchanan RW. Clozapine: efficacy and safety. *Schizophr Bull*. 1995;21:579-91.
- Meltzer HY, Alphas L, Green AI, Altamura AC, Anand R, Bertoldi A, et al. Clozapine treatment for suicidality in schizophrenia: International Suicide Prevention Trial (InterSePT). *Arch Gen Psychiatry*. 2003;60:82-91.
- Wahlbeck K, Cheine M, Essali A, Adams C. Evidence of clozapine's effectiveness in schizophrenia: a systematic review and meta-analysis of randomized trials. *Am J Psychiatry*. 1999;156:990-9.
- Kane JM, Correll CU. Past and present progress in the pharmacologic treatment of schizophrenia. *J Clin Psychiatry*. 2010;71:1115-24.
- Leslie RA, James MF. Pharmacological magnetic resonance imaging: a new application for functional MRI. *Trends Pharmacol Sci*. 2000;21(8):314-8.
- Chakos M, Lieberman J, Alvir J, Bilder R, Ashtari M. Caudate nuclei volumes in schizophrenic patients treated with typical antipsychotics or clozapine. *Lancet*. 1995;345:456-7.
- Frazier JA, Giedd JN, Kaysen D, Albus K, Hamburger S, Alagband-Rad J, et al. Childhood-onset schizophrenia: brain MRI rescan after 2 years of clozapine maintenance treatment. *Am J Psychiatry*. 1996;153:564-6.
- Scheepers FE, de Wied CC, Hulshoff Pol HE, van de Flier W, van der Linden JA, Kahn RS. The effect of clozapine on caudate nucleus volume in schizophrenic patients previously treated with typical antipsychotics. *Neuropsychopharmacology*. 2001;24:47-54.
- Scheepers FE, Gispen de Wied CC, Hulshoff Pol HE, Kahn RS. Effect of clozapine on caudate nucleus volume in relation to symptoms of schizophrenia. *Am J Psychiatry*. 2001;158:644-6.
- Molina V, Reig S, Sanz J, Palomo T, Benito C, Sanchez J, et al. Increase in gray matter and decrease in white matter volumes in the cortex during treatment with atypical neuroleptics in schizophrenia. *Schizophr Res*. 2005;80:61-71.
- van Haren NE, Hulshoff Pol HE, Schnack HG, Cahn W, Mandl RC, Collins DL, et al. Focal gray matter changes in schizophrenia across the course of the illness: a 5-year follow-up study. *Neuropsychopharmacology*. 2007;32:2057-66.
- Mattai A, Chavez A, Greenstein D, Clasen L, Bakalar J, Stidd R, et al. Effects of clozapine and olanzapine on cortical thickness in childhood-onset schizophrenia. *Schizophr Res*. 2010;116:44-8.
- Wenz F, Schad LR, Knopp MV, Baudendistel KT, Flomer F, Schroder J, et al. Functional magnetic resonance imaging at 1.5 T: activation pattern in schizophrenic patients receiving neuroleptic medication. *Magn Reson Imaging*. 1994;12:975-82.
- Schmitt A, Otto S, Jatzko A, Ruf M, Demirakca T, Tost H, et al. Parieto-prefrontal dysfunction during visuo-auditory information processing in elderly, chronic schizophrenic patients and medication effects. *Rev Psychiatr Clin*. 2009;36:89-96.
- Bustillo JR, Lauriello J, Rowland LM, Jung RE, Petropoulos H, Hart BL, et al. Effects of chronic haloperidol and clozapine treatments on frontal and caudate neurochemistry in schizophrenia. *Psychiatry Res*. 2001;107:135-49.
- Szulc A, Galinska B, Tarasow E, Kubas B, Dzienis W, Konarzewska B, et al. N-acetylaspartate (NAA) levels in selected areas of the brain in patients with chronic schizophrenia treated with typical and atypical neuroleptics: a proton magnetic resonance spectroscopy (1H MRS) study. *Med Sci Monit*. 2007;13:17-22.
- Ertugrul A, Volkan-Salanci B, Basar K, Karli Oguz K, Demir B, Ergun EL, et al. The effect of clozapine on regional cerebral blood flow and brain metabolite ratios in schizophrenia: relationship with treatment response. *Psychiatry Res*. 2009;174:121-9.
- Rodriguez VM, Andree RM, Castejon MJ, Zamora ML, Alvaro PC, Delgado JL, et al. Fronto-striato-thalamic perfusion and clozapine response in treatment-refractory schizophrenic patients. A 99mTc-HMPAO study. *Psychiatry Res*. 1997;76:51-61.
- Zhao J, He X, Liu Z, Yang D. The effects of clozapine on cognitive function and regional cerebral blood flow in the negative symptom profile schizophrenia. *Int J Psychiatry Med*. 2006;36:171-81.
- Molina V, Tamayo P, Montes C, De Luxan A, Martin C, Rivas N, et al. Clozapine may partially compensate for task-related brain perfusion abnormalities in risperidone-resistant schizophrenia patients. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2008;32:948-54.
- Ergun EL, Volkan-Salanci B, Ertugrul A, Demir B, Erbas B. Evaluation of SISCOP in routine regional cerebral blood flow alterations after clozapine, in schizophrenia. *Hell J Nucl Med*. 2010;13:35-9.
- Buchsbaum MS, Potkin SG, Marshall JF, Lottenberg S, Teng C, Heh CW, et al. Effects of clozapine and thiothixene on glucose metabolic rate in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*. 1992;6:155-63.

- 31 Cohen RM, Nordahl TE, Semple WE, Andreason P, Litman RE, Pickar D. The brain metabolic patterns of clozapine- and fluphenazine-treated patients with schizophrenia during a continuous performance task. *Arch Gen Psychiatry*. 1997;54:481-6.
- 32 Cohen RM, Nordahl TE, Semple WE, Pickar D. The brain metabolic patterns of clozapine- and fluphenazine-treated female patients with schizophrenia: evidence of a sex effect. *Neuropsychopharmacology*. 1999;21:632-40.
- 33 Lahti AC, Holcomb HH, Weiler MA, Medoff DR, Tamminga CA. Functional effects of antipsychotic drugs: comparing clozapine with haloperidol. *Biol Psychiatry*. 2003;53:601-8.
- 34 Lahti AC, Holcomb HH, Weiler MA, Medoff DR, Frey KN, Hardin M, et al. Clozapine but not haloperidol Re-establishes normal task-activated rCBF patterns in schizophrenia within the anterior cingulate cortex. *Neuropsychopharmacology*. 2004;29:171-8.
- 35 Molina V, Gispert JD, Reig S, Sanz J, Pascau J, Santos A, et al. Cerebral metabolic changes induced by clozapine in schizophrenia and related to clinical improvement. *Psychopharmacology (Berl)*. 2005;178:17-26.
- 36 Molina V, Sanz J, Sarramea F, Palomo T. Marked hypofrontality in clozapine-responsive patients. *Pharmacopsychiatry*. 2007;40:157-62.
- 37 Lee H, Tarazi FI, Chakos M, Wu H, Redmond M, Alvir JM, et al. Effects of chronic treatment with typical and atypical antipsychotic drugs on the rat striatum. *Life Sci*. 1999;64:1595-602.
- 38 Holcomb HH, Cascella NG, Thaker GK, Medoff DR, Dannals RF, Tamminga CA. Functional sites of neuroleptic drug action in the human brain: PET/FDG studies with and without haloperidol. *Am J Psychiatry*. 1996;153:41-9.
- 39 Wang HD, Dunnavant FD, Jarman T, Deutch AY. Effects of antipsychotic drugs on neurogenesis in the forebrain of the adult rat. *Neuropsychopharmacology*. 2004;29:1230-8.
- 40 Lieberman JA, Tollefson GD, Charles C, Zipursky R, Sharma T, Kahn RS, et al. Antipsychotic drug effects on brain morphology in first-episode psychosis. *Arch Gen Psychiatry*. 2005;62:361-70.
- 41 Yamamoto BK, Pehek EA, Meltzer HY. Brain region effects of clozapine on amino acid and monoamine transmission. *J Clin Psychiatry*. 1994;55:8-14.
- 42 Grobin AC, Deutch AY. Dopaminergic regulation of extracellular gamma-aminobutyric acid levels in the prefrontal cortex of the rat. *J Pharmacol Exp Ther*. 1998;285:350-7.
- 43 Meltzer HY, Bastani B, Ramirez L, Matsubara S. Clozapine: new research on efficacy and mechanism of action. *Eur Arch Psychiatry Neurol Sci*. 1989;238:332-9.
- 44 Davis CE, Jeste DV, Eyster LT. Review of longitudinal functional neuroimaging studies of drug treatments in patients with schizophrenia. *Schizophr Res*. 2005;78:45-60.
- 45 Arvanov VL, Liang X, Schwartz J, Grossman S, Wang RY. Clozapine and haloperidol modulate N-methyl-D-aspartate- and non-N-methyl-D-aspartate receptor-mediated neurotransmission in rat prefrontal cortical neurons in vitro. *J Pharmacol Exp Ther*. 1997;283:226-34.
- 46 Melone M, Bragina L, Conti F. Clozapine-induced reduction of glutamate transport in the frontal cortex is not mediated by GLAST and EAAC1. *Mol Psychiatry*. 2003;8:12-3.
- 47 Steen RG, Hamer RM, Lieberman JA. Measurement of brain metabolites by 1H magnetic resonance spectroscopy in patients with schizophrenia: a systematic review and meta-analysis. *Neuropsychopharmacology*. 2005;30:1949-62.
- 48 Navari S, Dazzan P. Do antipsychotic drugs affect brain structure? A systematic and critical review of MRI findings. *Psychol Med*. 2009;39:1763-77.
- 49 Dazzan P, Morgan KD, Orr K, Hutchinson G, Chitnis X, Suckling J, et al. Different effects of typical and atypical antipsychotics on grey matter in first episode psychosis: the AESOP study. *Neuropsychopharmacology*. 2005;30:765-74.
- 50 Corson PW, Nopoulos P, Miller DD, Amdt S, Andreasen NC. Change in basal ganglia volume over 2 years in patients with schizophrenia: typical versus atypical neuroleptics. *Am J Psychiatry*. 1999;156:1200-4.
- 51 Ende G, Braus DF, Walter S, Weber-Fahr W, Soher B, Maudsley AA, et al. Effects of age, medication, and illness duration on the N-acetyl aspartate signal of the anterior cingulate region in schizophrenia. *Schizophr Res*. 2000;41:389-95.
- 52 Heimberg C, Komoroski RA, Lawson WB, Cardwell D, Karson CN. Regional proton magnetic resonance spectroscopy in schizophrenia and exploration of drug effect. *Psychiatry Res*. 1998;83:105-15.
- 53 Honey GD, Bullmore ET, Soni W, Varatheesan M, Williams SC, Sharma T. Differences in frontal cortical activation by a working memory task after substitution of risperidone for typical antipsychotic drugs in patients with schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:13432-7.
- 54 Miller DD, Andreasen NC, O'Leary DS, Watkins GL, Boles Ponto LL, Hichwa RD. Comparison of the effects of risperidone and haloperidol on regional cerebral blood flow in schizophrenia. *Biol Psychiatry*. 2001;49:704-15.

ANEXOS

ANEXO A



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



Ribeirão Preto, 08 de fevereiro de 2012

Ofício nº 451/2012
CEP/MGV

Prezados Senhores,

O trabalho intitulado **“EFEITO DO NITROPRUSSIATO DE SÓDIO EM VOLUNTÁRIOS SAUDÁVEIS E PORTADORES DE ESQUIZOFRENIA: UM ESTUDO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA FUNCIONAL”**, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 339ª Reunião Ordinária realizada em 06/02/2012, e enquadrado na categoria: **APROVADO**, bem como o **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Voluntário Portador de Esquizofrenia – versão 2.0 de 17/01/2012** e o **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Voluntário Saudável – versão 2.0 de 17/01/2012**, de acordo com o Processo HCRP nº 14278/2011.

De acordo com Carta Circular nº 003/2011/CONEP/CNS, datada de 21/03/2011, o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última do referido Termo; o pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 196/96 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente.


DRª. MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimos Senhores
GIOVANA JORGE GARCIA
PROF. DR. JAIME EDUARDO CECÍLIO HALLAK(Orientador)
Depto. de Neurociências e Ciências do Comportamento