

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção



Dissertação

**Efeitos da administração crônica de Nimesulida e/ou
Haloperidol sobre os parâmetros bioquímicos e
comportamentais em camundongos**

Lucimar Marques Pinto

Pelotas, 2013

LUCIMAR MARQUES PINTO

**EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DE NIMESULIDA E/OU
HALOPERIDOL SOBRE OS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E
COMPORTAMENTAIS EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (Bioquímica e Bioprospecção).

Orientador(a): Adriana Lourenço da Silva
Co-orientador(a): Giovana Duzzo Gamaro

Pelotas, 2013

Dados de catalogação na fonte:
(Marlene Cravo Castillo – CRB-10/744)

P659e Pinto, Lucimar Marques

Efeitos da administração crônica de Nimesulida e/ou Haloperidol sobre os parâmetros bioquímicos e comportamentais em Camundongos / Lucimar Marques Pinto ; orientador Adriana Lourenço da Silva; co-orientador Giovana Duzzo Gamaro.- Pelotas,2013. 59f. : il. -Dissertação (Mestrado) –Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos . Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2013.

1.Esquizofrenia 2.Haloperidol 3.Nimesulida
4.Acetilcolinesterase I.Silva, Adriana Lourenço da(orientador) II
.Título.

Universidade Federal de Pelotas
CENTRO DE CIÊNCIAS QUÍMICAS FARMACÊUTICAS E DE ALIMENTOS

Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a
Dissertação de Mestrado

O USO DA NIMESULIDA NA REVERSÃO DOS EFEITOS EXTRAPIRAMIDAIS
INDUZIDOS PELO HALOPERIDOL

elaborada por

Lucimar Marques Pinto

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Ciências (Bioquímica e Bioprospecção)

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Giovana Duzzo Gamaro - Presidente/ Co-Orientadora –UFPeI

Prof^a. Dr^a. Francieli Moro Stefanello - UFPeI

Prof^a. Dr^a. Iraci Lucena da Silva Torres- UFRGS

Pelotas, março de 2013

*À Deus, pelo dom da vida
Aos meus pais, Ademar e Lucia
Ao meu noivo Vitor Brod*

*À vocês amores da minha vida, que em muitos momentos
acreditaram mais em mim do que eu mesma, que compartilharam
comigo as alegrias e dificuldades, dedico este trabalho e todo meu
amor!!*

Agradecimentos

A minha querida orientadora professora Adriana Lourenço da Silva, pela oportunidade, paciência, dedicação, amizade e orientação neste trabalho. Obrigado por sempre acreditar em mim;

A minha co-orientadora, professora Giovana Gamaro, pela disponibilidade, apoio e incentivo;

Aos meus queridos pais, Ademar e Lucia, e meus irmãos Luciano e Lissandro, pelo amor, carinho, incentivo e confiança. Vocês foram fundamentais para o meu crescimento profissional e para minha formação e dedicação escolar;

Ao meu noivo Vitor, com quem divido todas as minhas apreensões, incertezas, alegrias; a pessoa que compartilhou comigo toda esta etapa. A tua força, estímulo e confiança, foram indispensáveis para que eu chegasse até aqui. Te amo!

Aos amigos do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, em especial a Carmen Alves, e as professoras Fátima Beira e Maria Elvira Cruzeiro, muito obrigado pelo incentivo, amizade, credibilidade e carinho;

A minha querida amiga Thais Marten, pelo companheirismo, amizade, confiança e ensinamentos, os quais foram essenciais para a execução deste trabalho. E a colega de laboratório Cibeli Campesato, meu agradecimento e carinho pela ajuda e disponibilidade quando necessário;

Aos funcionários do Biotério Central da UFPEL, meu agradecimento pela ajuda e apoio durante toda a experimentação, e ao carinho com que sempre me receberam;

A professora Roselia Spanevello, obrigado pela contribuição no trabalho, ajuda e orientação;

A todos os docentes do programa de Pós Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, em especial aos que foram meus professores, pelos ensinamentos, disponibilidade e paciência;

A todos os meus colegas de mestrado, obrigado pelo bom convívio sempre, pela troca de ensinamentos e pelo coleguismo na apresentação dos trabalhos;

A minha querida colega e amiga Alice Kunzler, muito obrigado pelas conversas, apoio, incentivo e carinho quando precisei;

A UFPEL e ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção pela oportunidade;

A CAPES pelo auxílio financeiro;

A todos os amigos e pessoas que de alguma forma me ajudaram, meu sincero agradecimento a todos.

RESUMO

PINTO, Lucimar Marques. **Efeitos da administração crônica de Nimesulida e/ou Haloperidol sobre parâmetros bioquímicos e comportamentais em camundongos**. 2013. 59fls. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A esquizofrenia é um transtorno mental grave de evolução crônica, debilitante, que atinge cerca de 1% da população mundial, acarreta sérias consequências para seus portadores e familiares e com importante impacto econômico no sistema de saúde pública. O tratamento da esquizofrenia requer administração a longo prazo de fármacos antipsicóticos entre as quais o haloperidol, um antipsicótico típico, está entre os mais utilizados. No entanto, seus efeitos colaterais limitam o seu uso, destacando, os efeitos extrapiramidais. Seus efeitos farmacológicos, tanto terapêuticos quanto adversos, são resultantes de antagonismo de receptores de dopamina do tipo D2 mesolímbicos e, possivelmente, mesocorticais. Os efeitos extrapiramidais decorrem também deste antagonismo, principalmente em estriado, via mesolímbica-nigroestriatal. Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi verificar o efeito da administração crônica de Nimesulida nos sintomas extrapiramidais causados pelo Haloperidol, e a avaliação dos possíveis efeitos da acetilcolina em camundongos. Foram utilizados camundongos machos, inicialmente divididos em 4 grupos (N= 8-10/grupo) e tratados uma vez por semana durante 11 semanas com: G1-Salina (NaCl 0,9%), G2- Tween1%, G3- Haloperidol 7 mg/kg e G4- Haloperidol 14 mg/kg. A partir da 7ª semana, os grupos foram subdivididos para o tratamento adicional com o anti-inflamatório Nimesulida uma vez ao dia, até a 11ª semana (última), formando 7 grupos: G1A- Salina X Salina, G1B- Salina X Nimesulida, G2A- Tween 1% X Salina, G3A- Haloperidol 7 mg/kg X Salina, G3B- Haloperidol 7 mg/kg X Nimesulida, G4A- Haloperidol 14 mg/kg X Salina, G4B- Haloperidol 14 mg/kg X Nimesulida. Os testes realizados *in vivo*, demonstraram redução no número de bolos fecais em todos os grupos em relação ao controle G1A, que não foi revertido pela nimesulida, redução da atividade locomotora espontânea nos grupos G3A, G4A e G4B e aumento do efeito cataléptico nos grupos G3A e G4A, e reversão destes efeitos pela nimesulida no Grupo G3B. Contudo, esta reversão não ocorre via alteração nas atividades de AChE estriatal e hipocampal, uma vez que, independente dos tratamentos, não verificamos alteração desta

enzima. Já no córtex pré-frontal, o haloperidol produziu um aumento da atividade da enzima nos grupos G3A, G4A e G4B, e consequente diminuição da função colinérgica, sendo este efeito revertido pela nimesulida (Grupo G3B). Os resultados deste estudo sugerem uma possível influência da Nimesulida na atividade colinérgica e na reversão dos efeitos extrapiramidais causados pelo Haloperidol.

Palavras-chave: Esquizofrenia; Haloperidol; Nimesulida; Acetilcolinesterase.

ABSTRACT

PINTO, Lucimar Marques. **Effects of chronic administration of Nimesulide and / or haloperidol on behavioral and biochemical parameters in mice.** 2013. 59fls. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Schizophrenia is a severe mental disorder a chronic, debilitating condition that affects about 1% of the world population, has serious consequences for patients and their families and with important economic impact on the public health system. The treatment of schizophrenia requires long-term administration of antipsychotic drugs including haloperidol, a typical antipsychotic, is among the most used. However, its side effects limit its use, highlighting the extrapyramidal effects. Its pharmacological effects, both as therapeutic adverse are the result of antagonism of dopamine D2-type mesolimbic and possibly mesocorticals. Extrapyramidal effects also result of this antagonism, especially in striatum, mesolimbic pathway-nigrostriatal. In this context, the objective of this study was to investigate the possible reversal of the adverse effects of antipsychotic haloperidol by nonsteroidal anti-inflammatory drug nimesulide, and analyze the possible involvement of the enzyme AChE (Acetylcholinesterase) in the action of haloperidol and possible reversal induced by nimesulide. Male mice were used, initially divided into 4 groups (N = 8-10/group) and treated once a week for 11 weeks with: G1- Saline (NaCl 0.9%), G2- Tween 1%, G3- Haloperidol 7 mg/kg and G4- Haloperidol 14 mg/kg. From the 7th week, the groups were subdivided for additional treatment with anti-inflammatory drug Nimesulide once daily until the 11th week (last), forming seven groups: G1A- Salina X Salina, G1B- Salina X Nimesulide, G2A- Tween 1% X Salina, G3A- Haloperidol 7mg/kg X Salina, G3B- Haloperidol 7 mg/kg X Nimesulide, G4A- Haloperidol 14 mg/kg X Salina, G4B- Haloperidol 14 mg/kg X Nimesulide. Tests conducted in vivo, demonstrated a reduction in the number of dung in all groups compared to control G1A, which was not reversed by nimesulide, reduced spontaneous locomotor activity in groups G3A, and G4A G4B and increased cataleptic effect in groups G3A and G4A and reversal of these effects by nimesulide in Group G3B. However, this reversal does not occur via alteration in the activities of AChE hippocampal and striatal since, regardless of treatment, no significant alteration of this enzyme. Already in the prefrontal cortex, haloperidol produced an increase in enzyme activity in groups G3A, and G4A G4B,

and consequent decreased cholinergic function, and this effect was reversed by nimesulide (Group G3B). The results of this study suggest a possible influence of Nimesulide in cholinergic activity and the reversal of extrapyramidal effects caused by haloperidol.

Keywords: Schizophrenia, Haloperidol, Nimesulide, Acetylcholinesterase.

Lista de Abreviaturas

ACh	acetilcolina
AChE	acetilcolinesterase
COX-1	cicloxygenase-1
COX-2	cicloxygenase-2
EPS	efeitos extrapiramidais
GABA	ácido gama amino-butírico
IL-8	interleucina-8
IL-6	interleucina-6
NIH	National Institute of Mental Health
NMDA	N-metil D-aspartato
SNC	Sistema Nervoso Central

Sumário

1 Introdução	12
2 Objetivos	15
2.1 Objetivo Geral.....	15
2.2 Objetivos Específicos	15
3 Revisão Bibliográfica.....	16
3.1. Esquizofrenia.....	16
3.1.1 Histórico	16
3.1.2 Conceito	16
3.1.3 Causas.....	17
3.1.4 Sintomas	18
3.1.5 Fisiopatologia	18
3.1.6 Processo Inflamatório.....	19
3.1.7 Tratamento e Efeitos Adversos.....	19
3.2 Anti-Inflamatório – Nimesulida.....	21
3.3 Sistema Colinérgico	22
4 Manuscrito	24
5 Conclusões	51
Referências Bibliográficas	52

1 Introdução

A esquizofrenia é um transtorno mental crônico que afeta cerca de 1% da população mundial. Tendo início geralmente na adolescência ou início da idade adulta e, raramente, na infância (DUAN; LEVINSON; SHI; 2009). É uma doença devastadora que se reflete na produtividade dos indivíduos afetados e exige gastos permanentes com hospitalizações, tratamentos e reabilitações (BUCKLEY, 1998; RICE, 1999). Esta doença crônica é caracterizada por sintomas debilitantes, deterioração da capacidade funcional, falta de aceitação social, tornando-se entre as doenças mais incapacitantes e economicamente catastróficas (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 1994).

Tal patologia é definida pela presença de delírios e alucinações (sintomas positivos), apatia e retraimento social (sintomas negativos), e falhas cognitivas (LIDDLE, 1997). As causas desta doença ainda não são conhecidas e a maioria dos tratamentos têm sido focados na eliminação de sintomas por meio de bloqueio dopaminérgico (HOWES et al., 2012). A ação da anfetamina na indução ou agravamento dos sintomas psicóticos, sugere como causa a hiperatividade dopaminérgica. As vias dopaminérgicas afetadas pelo bloqueio do receptor pelos antipsicóticos, explica tanto seus efeitos no alívio dos sintomas positivos quanto na indução de efeitos extrapiramidais (EPS) que incluem movimentos involuntários anormais, distonia, acatisia, e discinesia tardia (SAWA, SNYDER, 2003).

Além do sistema dopaminérgico, outros sistemas de neurotransmissores podem estar envolvidos na etiologia desta síndrome, como o glutamatérgico e o colinérgico. Antagonistas de receptor de glutamato do tipo NMDA (N-metil D-aspartato), tais como a fenciclidina (PCP) e ketamina, induzem ou exacerbam os sintomas positivos. Adicionalmente, estudos mostram expressão reduzida de receptores glutamatérgicos em amostras *post mortem* de cérebro de indivíduos com diagnóstico de esquizofrenia (KARAM et al., 2010). O sistema colinérgico tem desempenhado um papel em sintomas negativos e cognitivos da doença (GALLETLY, 2009; TERRY, 2008). Os efeitos catalépticos de antagonistas do receptor de dopamina do tipo D2, podem ser induzidos pelo aumento da liberação

de acetilcolina no estriado com consequente ativação de receptores muscarínicos localizados em neurônios espinhosos estriatais (FINK-JENSEN, 2011). A acetilcolina (ACh) em córtex pré-frontal desempenha um papel importante em função motora e em vários domínios da cognição, como por exemplo, a atenção (PERRY et al., 1999) e a memória de trabalho (WINKLER et al., 1995). Portanto, o sistema colinérgico pode influenciar tanto a disfunção cognitiva induzida pela esquizofrenia quanto a capacidade de alguns fármacos antipsicóticos, principalmente os atípicos, de atuarem em aspectos de déficit cognitivo (MELTZER, McGURK, 1999).

Alguma atenção têm sido dada ao papel de infecção e de inflamação na esquizofrenia. As primeiras conclusões sobre esta hipótese mostraram que as infecções pré-natais com agentes bacterianos ou virais são associados com um risco aumentado para esquizofrenia na idade adulta (FAN; GOFF; HENDERSON, 2007). Pacientes esquizofrênicos podem apresentar diversas anormalidades imunológicas, incluindo expressão alterada de genes relacionados com a inflamação (ARION et al., 2007, SAETRE et al., 2007), número anormal de células T totais (MULLER et al., 1993), e concentrações anormais de citocinas e de receptores de citocinas no sangue e no líquido cerebrospinal (ZALCMAN et al., 1998; POTVIN et al., 2008; TEIXEIRA et al., 2008).

Com relação ao anti-inflamatório escolhido para este estudo, a Nimesulida, é um medicamento da classe dos anti-inflamatórios não esteróides (AINEs), que atua por meio da inibição da enzima ciclooxigenase (COX), e consequentemente, a cascata do ácido araquidônico, responsável pela síntese de substâncias envolvidas na inflamação, tais como as prostaglandinas. Atua preferencialmente inibindo COX-2, portanto tendo menores efeitos no trato gastrointestinal, importante ação quando administrado cronicamente (CHAWLA, SINGH, SINGLA, 2000). Além disso, enquanto inibidores seletivos COX-2 aumentam o risco de doenças cardiovasculares, a nimesulida não exerce cardiotoxicidade significativa (SULEYMAN et al., 2008).

Com relação ao tratamento de psicoses, especialmente a esquizofrenia, as terapias correntes incluem o uso de antipsicóticos típicos (por exemplo, haloperidol) e atípicos (por exemplo, clozapina e risperidona), que tanto exercem os seus efeitos primários por meio de antagonismo do receptor D2 de dopamina, bem como a atividade de uma variedade de outros receptores de monoaminas (SAWA, SNYDER, 2003). O tratamento da esquizofrenia requer administração a longo prazo dos

antipsicóticos. EPS, ganho de peso e sedação são exemplos de efeitos adversos que limitam a utilização de fármacos antipsicóticos e prejudicam a efetividade clínica destes medicamentos, interferindo na adesão ao tratamento em longo prazo (LIEBERMAN et al., 2003; RAY et al., 2009). Embora antipsicóticos atípicos sejam associados a um risco menor de EPS, estes fármacos apresentam um maior risco para o desenvolvimento de efeitos adversos metabólicos (McCREADIE et al., 2005; LEUCHT et al., 2009).

Neste contexto, considerando a importância da esquizofrenia e a gravidade dos efeitos colaterais dos antipsicóticos, a hipótese deste trabalho é de que o anti-inflamatório nimesulida ultrapassa a barreira hemato-encefálica e atua no estriado inibindo os efeitos extrapiramidais causados pelo haloperidol. Mais ainda, hipotetizamos que a ação da nimesulida influencia a atividade da enzima acetilcolinesterase e, conseqüentemente, a concentração de acetilcolina, minimizando os efeitos colaterais do haloperidol tanto em estriado quanto em córtex pré-frontal.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Verificar o efeito da administração crônica de Nimesulida nos sintomas extrapiramidais causados pelo Haloperidol, e a avaliação dos possíveis efeitos da acetilcolina em camundongos.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a atividade locomotora dos animais tratados com Haloperidol e Nimesulida por meio da tarefa comportamental campo aberto;
- Confirmar o efeito cataléptico dos animais após tratamento crônico com Nimesulida e Haloperidol;
- Determinar a atividade da enzima Acetilcolinesterase em estruturas cerebrais como estriado, hipocampo e córtex pré-frontal.

3 Revisão Bibliográfica

3.1. Esquizofrenia

3.1.1 Histórico

O cérebro e a mente são tão fundamentais para a atividade humana que suas doenças têm preocupado a humanidade por milênios. Síndromes que podemos reconhecer como formas de psicose aparecem nas peças de Eurípides e os escritos de Hipócrates. A doença que agora se referem como "esquizofrenia", recebeu seu primeiro delineamento amplamente aceito durante o final do século XIX, sob o nome de "demência precoce" (BARCLAY; KRAEPELIN; ROBERTSON; 1919).

3.1.2 Conceito

A esquizofrenia é uma doença psiquiátrica endógena, caracterizada por quadro de psicose crônica ou recorrente, levando a deterioração progressiva das capacidades funcionais, afetando cerca de 1% da população do mundo. Depois de um século de estudos, a etiologia deste transtorno permanece desconhecida. Diversos tipos de tratamentos farmacológicos têm sido largamente utilizados por quase meio século; no entanto, ainda existem poucas evidências de melhora substancial dos sintomas da esquizofrenia na maioria dos pacientes (INSEL, 2010).

A esquizofrenia é uma síndrome, pois representa uma coleção de sinais e sintomas de etiologia desconhecida, predominantemente definida por sinais observados de psicose. Na sua forma mais comum, apresenta delírios paranóicos e alucinações auditivas, normalmente inicia na adolescência, contudo os primeiros sintomas podem ocorrer na vida adulta. Tais sintomas iniciais da doença pouco mudaram ao longo do século passado. Esquizofrenia foi considerada uma "desordem de dopamina", considerando que eventos de psicose induzidos por fármacos liberadores de dopamina, como anfetaminas, e na eficácia dos

antipsicóticos que atuam bloqueando receptores de dopamina D2 (CARLSSON, 1988). Esta hipótese neuroquímica da esquizofrenia foi responsável pelo surgimento de medicamentos que transformaram o tratamento das psicoses, o que permitiu que os pacientes fossem tratados sem necessidade de internação, e em alguns casos, resultando em remissão dos principais sintomas da doença. Prejuízos cognitivos significativos têm sido descritos como as características centrais da esquizofrenia, especialmente em relação à memória, à atenção e ao funcionamento executivo. Esses prejuízos inevitavelmente têm um importante impacto sobre a consequência funcional da doença. E, embora os fármacos antipsicóticos serem confiáveis em reduzir delírios e alucinações, eles não têm reforçado a recuperação funcional destes pacientes (INSEL, 2010.)

3.1.3 Causas

Com relação às causas desta patologia, a neurofarmacologia vem dominando a pesquisa da esquizofrenia no século XX, e estudos genéticos têm sido o foco principal. Vários estudos com indivíduos gêmeos e familiares demonstraram alta hereditariedade (KETTY, 1987; MCGUFFIN, & GOTTESMAN, 1999), e a concordância relatada em gêmeos monozigóticos foi aproximadamente 50% maior do que em gêmeos dizigóticos (CARDNO et al., 1999). Fatores ambientais identificados até agora, estão implicados em eventos pré-natais e perinatais. Desnutrição materna durante gravidez (SUSSER & LIN, 1992; St CLAIR et al., 2005), infecções no segundo trimestre gestacional (BROWN, ERKITS, 2010) e lesão perinatal (CANNON, JONES, & MURRAY, 2002; ELLMAN et al., 2010) têm sido associados com o risco aumentado para esquizofrenia.

A esquizofrenia está associada com aumento de mortalidade por alterações cardiovasculares (WALKER, 1997; ENGER, 2004; HENNEKENS, 2005). Mais de dois terços dos pacientes com esquizofrenia, em relação a cerca de 50% da população em geral, morrem de doenças cardíacas (CURKENDALL et al., 2004; HENNEKENS, 2005; OSBY, et al., 2000). Esta alta taxa de mortalidade cardiovascular, pode ser parcialmente explicada, pelo estilo de vida desfavorável, incluindo abuso de nicotina, obesidade e atividade física reduzida (HENNEKENS, 2005).

3.1.4 Sintomas

Em se tratando dos sintomas psicóticos característicos da doença, os sintomas positivos envolvem principalmente delírios, alucinações e pensamento desorganizado. Geralmente, os pacientes experimentam uma combinação destes sintomas. Delírios são os sintomas psicóticos mais comuns e ocorrem em 65% dos pacientes com esquizofrenia (BERG, BREIER, 1999; KESHAVAN, NASRALLAH, TANDON, 2009), alucinações e pensamento desorganizado estão presentes em 50% destes pacientes. Alucinação auditiva é o distúrbio sensorial mais comum, no entanto, alucinações visuais, táteis, olfativas e gustativas também podem estar presentes (KITAMURA et al., 1998). Os sintomas negativos representam ausência de função normal. Eles refletem embotamento ou perda de funções afetivas e cognitivas. Estes sintomas incluem afeto embotado, alogia, anedonia, apatia, e associabilidade (KESHAVAN, NASRALLAH, TANDON, 2009; FOUSSIAS, REMINGTON, 2010). Domínios cognitivos também são afetados pela doença, e incluem déficits de atenção, linguagem, memória, alteração na velocidade de processamento e cognição social. Deficiências cognitivas são fortes precedentes de resultados sociais e formação profissional deficiente. Estes sintomas estão presentes na fase pré-mórbida da doença esquizofrênica e persistem durante um longo tempo (SAYKIN et al., 1991; KESHAVAN, NASRALLAH, TANDON, 2009). Os sintomas de depressão e ansiedade estão presentes na maioria dos pacientes com esquizofrenia em algum ponto durante o curso da doença. A ansiedade pode ser considerada como uma comorbidade (KESHAVAN, NASRALLAH, TANDON, 2009).

3.1.5 Fisiopatologia

Anormalidades estruturais do cérebro são frequentes em pessoas com esquizofrenia. Estas incluem, mas não estão limitadas, a dilatação ventricular lateral, temporal e frontal do córtex, com alterações da substância cinza e branca. Existe evidência de que estas deficiências são, em parte, devido a alterações no desenvolvimento cerebral e a perda neuronal progressiva após o início da doença. Alterações neuroquímicas envolvidas na fisiopatologia incluem uma ampla variedade de neurotransmissores (dopamina, serotonina, glutamato, ácido gama-aminobutírico-GABA) e seus receptores, tanto pré quanto pós-sinapticamente (KESHAVAN et al,

2008). Pesquisa recente demonstrou que hipofunção glutamatérgica pode ser a causa das alterações na transmissão dopaminérgica na esquizofrenia, como hiperfunção límbica e hipofunção no córtex frontal (SWERDLOW et al., 2009). As atividades do sistema glutamatérgico estão intimamente relacionadas ao sistema imune e ao metabolismo do triptofano-quinurenina, e ambos parecem desempenhar papel chave na patofisiologia da esquizofrenia (MÜLLER e SCHWARZ, 2007a, 2007b). Além disto, uma importante descoberta em análises *post-mortem* de cérebros de pacientes esquizofrênicos é a diminuição da principal enzima responsável pela síntese de GABA, a GAD67.1 (AKBARIAN, 1995; HASHIMOTO, LEWIS, VOLK, 2005).

3.1.6 Processo Inflamatório

Em seres humanos, o aumento dos níveis maternos da citocina pró-inflamatória IL-8 (interleucina-8) durante a gravidez, têm sido relacionados com maior risco para esquizofrenia no bebê, independente da razão para o aumento de citocina pró-inflamatória (BROWN, 2006). Somando-se a isto, a glia ativada libera uma variedade de citocinas pró-inflamatórias que contribuem para a disfunção neuronal. Níveis elevados de S100B, uma proteína derivada da glia, têm sido observados no soro de pacientes com esquizofrenia, sugerindo um papel glial na doença. Avaliou-se a secreção de S100B (em células de glioma C6 e fatias de hipocampo de ratos Wistar) e a sua possível modulação por citocinas inflamatórias (interleucinas 6 e 8) alteradas na esquizofrenia. (SOUZA et al., 2012). S100B é uma proteína produzida primariamente por astrócitos. O aumento dos níveis séricos de proteína S100B refletem dano neuronal. Anticorpos podem atravessar a barreira hemato-encefálica e combinar-se com antígenos no cérebro, formando complexos imunes e resultando em dano neuronal (AL-AYADHI, MOSTAFA, 2012).

3.1.7 Tratamento e Efeitos Adversos

Com relação à terapia medicamentosa, os antipsicóticos tornaram-se a base do tratamento para a esquizofrenia. A primeira geração dos "antipsicóticos convencionais" são antagonistas de receptores de dopamina D2 de alta afinidade, os quais são mais eficazes contra os sintomas psicóticos positivos e menos para os

negativos, e apresentam altos índices de efeitos colaterais neurológicos, tais como os EPS (MIYAMOTO et al., 2005). A introdução da segunda geração de antipsicóticos, ou "antipsicóticos atípicos", prometeu maior eficácia e segurança (KANE et al., 1988). Os agentes atípicos diferem farmacologicamente dos agentes antipsicóticos típicos pela sua menor afinidade para receptores de dopamina D2 e maior afinidade para outros receptores, incluindo serotoninérgicos e adrenérgicos (MIYAMOTO et al., 2005).

A maioria dos fármacos antipsicóticos típicos, induzem EPS, necessitando muitas vezes de medicações antiparkinsonianas concomitantemente. Além disto, a presença de EPS, é preditiva de pacientes que podem apresentar discinesia tardia, um efeito colateral extremamente grave associado a terapia de longo prazo com antipsicóticos (CASEY, 1999). Trata-se de uma síndrome potencialmente irreversível caracterizada por movimentos involuntários hiperkinéticos que ocorrem durante o curso do tratamento. (KANE, LIEBERMAN, WOERNER, 1988). Têm sido sugerido que o bloqueio prolongado dos receptores de dopamina do tipo D2 e/ou a hipersensibilidade dos receptores de dopamina pós-sinápticos no estriado, estão implicados na fisiopatologia da discinesia tardia (TAMMINGA e WOERNER, 2002). Modelos animais são usados para verificar atividade antipsicótica e alguns efeitos adversos motores dos neurolépticos, como por exemplo, a catalepsia, fenômeno caracterizado pela imobilidade em posturas não naturais com hipertonía muscular (Kaplan et al., 1997) e pode ser induzida por antipsicóticos (HOFFMAN e DONOVAN, 1995). Uma vez que o haloperidol é um antagonista dopaminérgico, o bloqueio das vias dopaminérgicas do gânglio basal são relacionadas a este fenômeno (COSTALL e NAYLOR, 1971).

A eficácia dos fármacos antipsicóticos no tratamento da esquizofrenia ocorre em apenas cerca de 50% dos pacientes (KERWIN, OSBORNE 2000; MIYAMOTO et al., 2005). Efeitos colaterais precoces, exacerbação dos sintomas, recaída, maior risco de hospitalização associado a aumento dos custos de tratamento, são fatores associados a interrupção do tratamento (AYUSO-GUTIÉRREZ, DEL RÍO VEJA, 1997). A avaliação da efetividade da prescrição de um fármaco antipsicótico deve considerar o grau da doença prévio ao tratamento e a reversão de sintomas após o início do tratamento. Déficits de função cognitiva (HARVEY et al., 2005), psicose não tratada (PERKINS et al., 2005) e sexo masculino (ALEMAN, KAHN, SELTEN, 2003), são fatores de risco associados a refratariedade ao tratamento com antipsicóticos.

Mais ainda, diante de diferentes opções de tratamento para esquizofrenia, um estudo clínico conduzido pelo NIH (*National Institute Mental Health*) em 2005, comparou antipsicóticos de nova geração aos clássicos como a perfenazina, considerando que aqueles apresentam um custo 10 vezes maior que estes. Este estudo não encontrou vantagem em termos de eficácia dos novos medicamentos em comparação com os clássicos. Deste modo, permanece a necessidade de aprofundar o conhecimento dos efeitos farmacológicos das diferentes classes de fármacos utilizados no tratamento das psicoses. Enfim, a escolha do medicamento antipsicótico deve ser baseada na preferência individual, resposta ao tratamento prévio, histórico e perfil de efeitos adversos, histórico médico e de adesão aos fármacos (TANDON, 2011).

3.2 Anti-Inflamatório – Nimesulida

Recentemente, tem-se pesquisado os efeitos de anti-inflamatórios não esteroidais sobre o sistema nervoso central. Dentre este grupo, a nimesulida, apresenta efeitos gerais sobre a inflamação e outros processos bioquímicos que conduzem o seu modo de ação multifatorial (RAINSFORD, 2006). A estrutura química da nimesulida é n-(4-nitro-2-fenoxifenil)-sulfonamida de metano, e foi descoberta pela primeira vez na Itália, em 1985, como uma droga antipirética, analgésica e anti-inflamatória. A nimesulida é um inibidor preferencial da enzima ciclooxigenase-2 (COX-2) pois a afinidade para a COX-2 é 5 a 16 vezes superior relativamente à COX-1 (SULEYMAN et al., 2008). No entanto, sua ação anti-inflamatória e analgésica também envolve a atividade em vasta gama de mediadores da dor e de vias intracelulares (AKARSU, ATAOLGU, DOGAN, 2002; RAINSFORD, 2006b). Os efeitos colaterais mais comuns associados aos tratamentos com anti-inflamatórios não esteroidais são efeitos sobre o sistema gastrointestinal, os quais variam de uma hemorragia interna até perfuração de úlcera. No entanto, tais efeitos são relacionados à inibição da enzima COX-1 e, portanto, são menos relacionados à nimesulida.. Em contraste a inibidores preferenciais COX-2, a nimesulida não exerce toxicidade cardiovascular significativa (RAINSFORD, 2006a). Enquanto algumas evidências do efeito analgésico da nimesulida têm sido associado a ações no sistema nervoso central (TASSORELLI et al., 2003), no entanto não há relatos de efeitos diretos da nimesulida em neurônios sensoriais. Efeitos de inibidores da COX-

2 sobre a cognição (MÜLLER et al., 2005) e na psicopatologia geral têm sido descritos (AKHONDZADEH et al., 2007). Os animais com uma sobre-expressão genética de COX-2 demonstraram déficits proeminentes da cognição, que foram atenuadas por um inibidor preferencial da COX-2 (MELNIKOVA et al., 2006).

3.3 Sistema Colinérgico

Com relação ao sistema colinérgico, receptores de acetilcolina (ACh) muscarínicos são altamente expressos no sistema nervoso central (SNC) (LEVEY, 1993; MENGOD, PALACIOS, VILARO, 1993), onde eles estão envolvidos em várias funções, como por exemplo, aprendizagem, memória, recompensa e desempenho motor (BYMASTER et al., 2003; WESS, 2004). A regulação da concentração de acetilcolina, é feita pela enzima Acetilcolinesterase (AChE). Trata-se de uma serina hidrolase que catalisa a hidrólise de acetilcolina nas sinapses do SNC e nas junções neuromusculares, sendo considerada um bom indicador da atividade colinérgica (SOREQ & SEIDMAN, 2001). Esta enzima desempenha um papel essencial na regulação de muitas funções vitais como aprendizagem e memória, processamento da informação sensorial, organização cortical do movimento e controle do fluxo sanguíneo cerebral (MESULAM, 2002).

É bem conhecido que há um equilíbrio delicado entre o sistema dopaminérgico e o sistema colinérgico com respeito à função motora. Desequilíbrio entre os dois sistemas pode resultar em disfunção motora, como observado em pacientes com doença de Parkinson e em pacientes com sintomas parkinsonianos após o tratamento com antipsicóticos (antagonismo de receptor D2) (CONSOLO, DI CHIARA, MORELLI, 1994). Provavelmente isto ocorra devido a interneurônios colinérgicos do estriado expressarem receptores da dopamina D2 (BLOCH, LE MOINE, TISON, 1990) e inervarem neurônios espinhosos médios os quais se projetam para a substância negra ou para o globo pálido (FIBIGER, ROBERTSON, VINCENT, 1992.). Com isso, o bloqueio de receptores D2 no estriado aumenta a liberação estriatal de ACh (DAMSMA et al., 1990; ABERCROMBIE e DEBOER, 1996). Os efeitos motores induzidos por antipsicóticos em humanos e catalepsia em roedores, podem ser revertidos por antagonistas muscarínicos não seletivos (KLEMM, 1985; KATZENSCHLAGER et al., 2003). Além disso, a ACh regula circuitos no núcleo *accumbens* de uma forma aparentemente oposta à dopamina,

possivelmente diminuindo a liberação excessiva desta (AVENA, HOEBEL, RADA, 2007). Com isso, é necessário um equilíbrio delicado entre a dopamina e atividade estriatal colinérgica, para que ocorra um ótimo funcionamento cerebral (AOSAKI et al., 2010; HIKIDA et al, 2003).

Considerando o exposto acima, a prevalência da esquizofrenia e sua cronicidade, a procura por tratamentos alternativos ou complementares na esquizofrenia é plenamente justificada. Além disto, um grupo considerável de pacientes ainda é refratário aos tratamentos disponíveis, muitas vezes não respondendo adequadamente ao tratamento com antipsicóticos atípicos, e continuam utilizando os antipsicóticos clássicos apesar dos EPS. Com isso, é importante analisar a origem do desenvolvimento destes efeitos adversos (tanto extrapiramidais como metabólicos) e novas alternativas terapêuticas para atenuá-los.

4 Manuscrito

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de um manuscrito. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas encontram-se inseridos no manuscrito. A apresentação do manuscrito segue as normas de publicação da revista: *Behavioural Pharmacology*.

Manuscrito: Nimesulide Reverts Haloperidol-Induced Extrapramidal Effects.

Submetido a *Behavioural Pharmacology*

NIMESULIDE REVERTS HALOPERIDOL-INDUCED EXTRAPYRAMIDAL EFFECTS

Lucimar Marques Pinto^{1,2}, Thais Marten², Cibeli Bastos Marques Campesato², Fabiano José Souza Soares³, Roselia Maria Spanevello^{1,3}, Giovana Duzzo Gamaro^{1,3}, Adriana Lourenço da Silva^{1,2}.

¹ PPG em Bioquímica e Bioprospecção, CCQFA, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário, S/N, Capão do Leão. Caixa Postal 354, CEP 96010-900.

² Laboratório de Neurofarmacologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário, S/N, Capão do Leão. Caixa Postal 354, CEP 96010-900.

³ Departamento de Bioquímica, CCQFA, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário, S/N, Capão do Leão. Caixa Postal 354, CEP 96010-900.

Running head: Haloperidol, Nimesulida and extrapyramidal effects.

Corresponding author: Adriana Lourenço da Silva. PPG em Bioquímica e Bioprospecção, CCQFA, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário, S/N, Capão do Leão. Caixa Postal 354, CEP 96010-900.

Phone: 55 53 3275-7337

e-mail: adrilourenco@gmail.com

ABSTRACT

Antipsychotics, including haloperidol, are effective to treat patients with schizophrenia. This study was conducted in order to analyze the extrapyramidal effects of this drug, originated in the striatum-nigrostriatal mesolimbic pathway, in reverse the effects through the use of anti-inflammatory nimesulide. We also analyze the possible reversal by the action of the enzyme acetylcholinesterase (AChE). Male mice were chronically treated with haloperidol 7mg/kg or 14mg/kg i.p. for 11 weeks, and starting the 7th week nimesulide 20mg/kg i.p. was added to haloperidol. Spontaneous locomotor activity, catalepsy induction and AChE assay were analyzed in different time-treatment. Our data showed that haloperidol reduced the spontaneous locomotor activity, and increased the cataleptic effect. This effect was opposite to found in nimesulide + haloperidol group. Therefore no effects were found related with AChE pathways in the striatum. But, there is an increase of AChE enzyme activity in the prefrontal cortex, resulting in a decrease in acetylcholine, and this effect was reversed by the action of nimesulide. Taken together, these results suggest a possible influence of Nimesulide in cholinergic activity and the reversal of extrapyramidal effects caused by haloperidol.

Keywords: schizophrenia, haloperidol, nimesulide, acetylcholinesterase.

INTRODUCTION

Many hypotheses have been proposed to explain the mechanism of schizophrenia, and the most accepted idea today - a revision of the classical dopamine hypothesis - states overactive dopaminergic projections in the mesolimbic pathway, combined with hypostimulation mesocortical pathway. Occur, therefore, an imbalance cortical / subcortical dopamine release on. This imbalance possibly occurs due the activity of different dopaminergic pathways be modulated specifically by other neurotransmitters as serotonin, glutamate and GABA (Haleem et al., 2004). Moreover, recent research suggests that altered signaling via the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor subtype of glutamate receptors; GABA_A receptors in the prefrontal cortex; and muscarinic (mAChR) and nicotinic (nAChR) cholinergic receptors may contribute to all three symptom clusters of schizophrenia (Lisman et al., 2008; Marin, 2012; Noetzel et al., 2012; Sarter et al., 2012). Dysfunction in the hippocampal cholinergic system has been linked to cognitive deficits and a variety of neurological diseases, including schizophrenia. (Yakel JL., 2013). With respect to the cholinergic system, more precisely the AChE, it is an important regulatory enzyme that controls the transmission of nerve impulses across the synapse cholinergic by rapid hydrolysis and inactivation of acetylcholine by modulating the concentration of neurotransmitter in the synapses (Grisaru et al., 1999; Soreq&Seidman, 2001). Moreover, the increasing cholinergic signaling via administration of acetylcholinesterase (AChE) inhibitors can improve cognitive performance (Feldman et al., 2007; Forette et al., 1999), becoming the cholinergic signaling an attractive target to treat a multitude of disorders associated with cognitive impairments.

With respect to the pharmacological treatment, the classical antipsychotic drugs used to treat schizophrenia have in common the ability to antagonize postsynaptic dopaminergic receptors. Such drugs are classified into typical and atypical antipsychotics. The classical or typical antipsychotics, such as haloperidol, chlorpromazine among others, present extrapyramidal effects, little or no effect in controlling negative symptoms are more accessible to low-income population and, in general, there is no significant improvement in cognitive function. Already atypical antipsychotics, such as clozapine, risperidone and quetiapine, already have the highest cost, and have an effect on negative symptoms. Such drugs used for the disorder have failed to alter the course of the disease but only provide symptomatic relief (Davis et al., 1991; Baldessarini et al., 2001). Moreover, the over all outcomes functionality and quality of life these patients, after treatment, still remain poor (Baldessarini et al., 2001; Mullen et al., 2006). In addition, adverse effects associated with antipsychotic use have limited the clinical efficacy of these drugs (Ray et al., 2009). Extrapyramidal symptoms, weight gain, and sedation can interfere with long-term adherence to maintenance drug therapy (Lieberman et al., 2003). Although atypical antipsychotic drugs have been associated with a lower risk of extrapyramidal symptoms, which include abnormal involuntary movements like Parkinsonism, dystonia, akathisia, and tardive dyskinesia, these drugs pose a higher risk for the development of metabolic adverse events (McCreadie et al., 2005; Leucht et al., 2009).

More recently, it has been suggested that atypical antipsychotics also exhibit anti-inflammatory action. Clozapine, olanzapine and risperidone, but not haloperidol, suppress tumor necrosis factor (TNF)- α and interleukin (IL) -6 (Sugino et al., 2009). It has been postulated correlation between the immune system, the dopaminergic and the glutamatergic system in the pathogenesis of schizophrenia (Aguiar et al., 2010, Müller et al., 2010) and the association between increased inflammatory responses with extrapyramidal symptoms of

Parkinsonism (Grunblatt et al., 2000). But it is unclear whether the possible anti-inflammatory action was related to the low incidence of extrapyramidal side effects of atypical antipsychotics.

Within the classes of anti-inflammatory drugs, the Nimesulide, is a non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID), administered orally or rectally twice daily for a variety of inflammation and pain states. This is a unique NSAID, not only because of its chemical structure but also because of its selective affinity to inhibit cyclooxygenase-2 (COX-2), exerting milder effects on the gastrointestinal mucosa. (Singla et al. 2000). In addition, while selective COX-2 inhibitors increase the risk for cardiovascular diseases, nimesulide does not exert significant cardiotoxicity (Suleyman et al., 2008).

The objective of this study was to determinate the adverse effects of haloperidol, in vivo, in two different doses 7mg/Kg and 14mg/Kg, to evaluate the possible reversal effects by direct anti-inflammatory drug nimesulide and determinate the action on AChE enzyme activity in different brain structures related with extrapyramidal effects on increase of memory processes.

MATERIALS AND METHODS

DRUGS

Haloperidol Decanoate, controlled-release solution (Haldol®-Janssen-Cilag) was dissolved in 1% Tween 80, and applied intramuscularly (IM) once a week at a dose of 7 mg / kg, equivalent to 0.1 mg/Kg/day or 14 mg/kg, equivalent to 0.2 mg/Kg/day, Haloperidol unconjugated (Fachinetto et al. 2005). Nimesulide was dissolved in Tween 80 1% (v/v), and applied intraperitoneally (IP) once daily at a dose of 20 mg/kg.

ANIMALS

We used 65 CF1 male mice at 1 month of age and kept in conditions of food and water ad libitum, controlled temperature ($21 \pm 2^{\circ}\text{C}$) and light-dark cycle of 12 hours. The animals (N = 8-10) were divided into 4 groups initially and after 6 weeks re-divided into 7 groups. The handling of mice was done in accordance with the Guiding Principles for the International Biomedical Research Involving Animals (Council for International Organizations of Medical Sciences - CIOMS) and all efforts were made to minimize animal suffering and reduce the number of animals used. This work was approved by the Ethics and Animal Experimentation Committee (EAEC) - UFPel No. 10602.

EXPERIMENTAL PROCEDURE

The animals initially divided into four groups were treated with: Saline (0.9% NaCl), Tween 80 1% (v/v), Haloperidol 7 mg/kg and Haloperidol 14 mg/kg once a week. After 6 weeks, the groups were re-divided for further treatment with anti-inflammatory Nimesulide, forming 7 groups: Saline X Saline, Saline X Nimesulide, Tween X Nimesulide, Haloperidol

7mg/kg X Saline, Haloperidol 7mg/kg X Nimesulide, Haloperidol 14mg/kg X Saline, Haloperidol 14mg/kg X Nimesulide. From then the 7th week, the administration of Nimesulide and each corresponding group of Saline, is now once daily and continued Haloperidol was administered once a week until the 11th week. The animals were weighed in all administrations.

Spontaneous locomotor activity

This test was performed in the 11th week. The method adapted from (Creese et al., 1976) evaluated the locomotor activity and number of fecal bolus in the open field (50 x 60 x 60cm). After treatment the animals are placed individually in the box to assess its performance engine for 5 minutes.

Induction of catalepsy

This test was performed at 10 weeks. The animals were placed in an almost vertical position with forepaws resting on a horizontal bar 6 cm above the bench, supported by two wooden blocks (Fink-Jensen et al., 2011). The duration of catalepsy was marked from the instant when the animals were placed on the bar until the instant removed both forepaws of the bar with their hindlimbs. The cataleptic behavior was measured considering the time the animal remained supported on the bar was recorded for ten times, with an interval of 5 min.

AChE Assay in Brain Structures

Brain structures striatum, hippocampus (HP), cerebral cortex (CC) were separated and placed in a solution of 10 mM Tris - HCl, pH 7.4, on ice. Brain structures were homogenized in a glass potter in Tris - HCl solution. Aliquots of resulting brain structure homogenates were stored at -80°C until utilization. Protein varied for each structure: HP (0.8 mg/mL) and CC (0.7 mg/mL).

The AChE enzymatic assay in brain regions was determined by a modification of the spectrophotometric method of Ellman et al., 1961 as previously described by Rocha et al., 1993. The reaction mixture (2 mL final volume) was composed of 50 mM K⁺-phosphate buffer, pH 7.5 and 1 mM of DTNB. The method is based on the formation of yellow anion, 4,4 - dithio-bis-acid-nitrobenzoic measured by absorbance at 412 nm for 2 min incubation at 25°C. The reaction was initiated by adding 0.8 mM acetylcholine iodide. All samples were run in duplicate or triplicate, and the enzyme activity was expressed in micromole AcSCh/h/mg of protein.

Statistical analysis

The data were expressed as mean $\pm$ SEM. Spontaneous locomotor activity and fecal bolus were analyzed by One-way ANOVA, induction of catalepsy activity were analyzed by repeated measures ANOVA (the within subjects factor was time; between subjects factors were treatments); comparisons between groups were run using the Duncan post-hoc test. A level of $P > 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

Behavioral Measures

When we analysed spontaneous locomotor activity the One-way ANOVA revealed a significant effect of treatment [$F(6.62) = 10.10$, $P < 0.01$]. Figure 1 shows a decrease in locomotor activity G3A: haloperidol 7 mg/kg X saline, G4A: haloperidol 14 mg/kg X saline and G4B: haloperidol 14 mg/kg X nimesulide, with respect to controls (Duncan test, $P < 0.05$). Furthermore, the G3B shows a reversal of the hipolocomotion by nimesulide (Duncan test, $P < 0.05$). In figure 2, the number of fecal bolus shown a decrease in the amount of dung pats in all groups compared to the control G1A, no reversal of the effect with the use of nimesulide. One-way ANOVA [$F(6.62) = 3.4$, $P < 0.01$].

The catalepsy effects was showed in figure 3, the groups G3A and G4A showed an increased cataleptic effect with respect to controls [$F(1.54) = 54.43$, $P < 0.05$], as expected. Furthermore, the G3B shows a reversal of the effect by nimesulide (Duncan test, $P < 0.05$) [$F(6.62) = 3.4$, $P < 0.01$].

AChE Assay in Brain Structures

The dosage of AChE differs between groups in the prefrontal cortex. According to figure 4, haloperidol produced an increase in AChE enzyme activity in groups G3A, G4A and G4B, with a reversal of the effect by nimesulide group G3B [$F(6.28) = 3.4$, $P = 0.015$]. This reversal has not occurred in the group G4B. Already in the striatum and hippocampus, there was no difference between groups in the enzyme dosage. (Figures 5 and 6) (Duncan test, $P < 0.05$).

DISCUSSION

In contrast with atypical antipsychotics, that have fewer extrapyramidal effects haloperidol is a typical antipsychotics frequently used in clinical patients due the low cost and good efficiency. These effects are associated with two factors: blockade of dopamine D2 receptors in mesolimbic nigrostriatal pathway, and elevated levels of ACh release in the striatum by blocking dopamine D2 receptors (Ikarashi et al., 1997). In this work we evaluated the effect of 11 weeks treatment with haloperidol on behavioral tasks that involved locomotor activity and catalepsy. The animals treated with haloperidol decanoate controlled-release solution, (Haldol ® - Janssen-Cilag), they showed a decreasing locomotor activity with increase the cataleptic effect. When compared groups that receive saline and tween. These findings suggest that have an increased in cholinergic activity secondary to blockade of the D2 receptor particularly the striatum mesolimbic nigrostriatal pathway. For these reason to reduce extrapyramidal adverse effects the patients can be treated with anticholinergic drugs with conventional antipsychotics. However, these cause anticholinergic adverse effects characteristic as xerostomia, blurred vision, xerophthalmia, constipation and flushed skin. Delayed micturition, urinary retention and sexual dysfunction are occasionally seen (Bezchlibnyk-Butler et al., 2009).

Accumulating evidence suggest that cholinergic system, more precisely the AChE (acetylcholinesterase) it is an important regulatory enzyme that controls the transmission of nerve impulses across the cholinergic synapse by rapid hydrolysis and inactivation of acetylcholine by modulating the concentration of neurotransmitter in the synapses (Grisaru et al., 1999; Soreq&Seidman, 2001). Our study, *in vitro* studies, showed that the enzyme

activity AChE in striatum and hippocampus not change with chronic administration of haloperidol; and *in vivo* studies, we found the same result in agreement with the literature. Additionally, we found a reduction of locomotion, increased cataleptic effect and a reversal of the effect by the nimesulide mainly in the group G3B (Haloperidol 7 mg/kg X Nimesulide). Moreover, in the other group that received nimesulide G4B (Haloperidol 14 mg/kg X Nimesulide), this reversal did not occur. This reversal of the effects by nimesulide did not occur via AChE, since we did not observe changes in the striatum of this enzyme independent of treatments. According Goverdhan et al. 2012, the inhibition of AChE via inhibitors of COX-2, increases the extrapyramidal effects via acetylcholine, however this did not occur both *in vivo* tests and *in vitro*. We suggest, the existence of different isoforms of intrinsic and distribution of cholinergic neurons in this brain area. The dose of 7 mg/kg extended release of haloperidol (group G3) administered 1x/week is similar to the therapeutic dose used in humans. This effect can be explained by differences in metabolism between species. In contrast the dose of 14 mg/kg (group G4), corresponding to an overdose in order to further analyze the adverse effects. We can conclude that nimesulide failed to reverse the effects of G4B group (Haloperidol 14 mg/kg X Nimesulide), possibly due to high levels of haloperidol in brain.

The main neurotransmitter system alterations in schizophrenia are the dopaminergic and glutamatergic system. The modulation of dopaminergic system is related to the region of brain analysed. In limbic system there are a hyperfunction while in frontal cortex are hypofunction. In untreated patients the dopaminergic mesocortical pathways project to the frontal cortex, proposals were hypothesized to be hypoactives. This hypoactivity is associated with cognitive, affective and negative symptoms schizophrenia. The administration of an antagonist of D2 could further reduce activity in this pathway and thus not only fail to improve these symptoms, but also, in fact, aggravate them potentially (Stahl, 2011).

According to the results, the groups treated with haloperidol at two doses (7 and 14 mg/kg), they showed an increase in the activity of AChE enzyme, in prefrontal cortex. Acetylcholine is a neurotransmitter important for different forms of learning, memory, and experience-dependent plasticity. Lesions of cholinergic nuclei (Aigner et al., 1991; Everitt and Robbins, 1997), disruption of cholinergic transmission (Ebert and Kirch, 1998), or genetic deletion of acetylcholine receptors (Anagnostaras et al., 2003) impairs cognitive function, although the reasons for the deficits remain controversial. Postmortem studies showed a decrease in expression levels of muscarinic acetylcholine receptors in various brain regions of patients with schizophrenia, including the prefrontal cortex, striatum and hippocampus (Dean et al., 1996; Crook et al., 2000; Zavitsanou et al., 2004). Molecules that stimulated cholinergic signaling have extensively demonstrated efficacy in the treatment of numerous groups of symptoms in schizophrenic patients. Unfortunately, these compounds induce adverse effects, mainly by activation of peripheral receptors that limit its clinical usefulness (Foster et al., 2012).

In conclusion, we confirm the adverse effects - decreased locomotor activity and increased catalepsy - all groups in the presence of haloperidol. Adding to this, the anti-inflammatory nimesulide reverted in these effects us groups with haloperidol at a dose of 7 mg/kg. In other words, the lowest dose able of to reverted, suggesting a possible anti-inflammatory activity only at a dose corresponding to therapy. And finally, with respect to the cholinergic system, haloperidol increased the activity of the enzyme AChE only in the prefrontal cortex, with no significant change in the striatum and hippocampus. The nimesulide reversed this increase only in the group with the lowest dose of haloperidol, 7mg/kg, again indicating the interference of nimesulide only in therapeutic dose. This suggests a possible influence of anti-inflammatory drug in the improvement of cognitive and negative symptoms of schizophrenia, secondary to increasing concentrations of acetylcholine. Future studies are

needed to assess the effect of these treatments, related to the activity of the prefrontal cortex on cognitive processes or negative symptoms of schizophrenia, such as social interaction.

REFERENCES

- Aguiar, C. C. T. et al. (2010). Esquizofrenia: uma doença inflamatória? J. Bras. Psiquiatr.59: 52-57
- Aigner TG, Mitchell SJ, Aggleton JP, DeLong MR, Struble RG, Price DL, Wenk GL, et al. (1991). Transient impairment of recognition memory following ibotenic-acid lesions of the basal forebrain in macaques. Exp Brain Res 86:18 –26
- Anagnostaras SG, Murphy GG, Hamilton SE, Mitchell SL, Rahnama NP, Nathanson NM, Silva AJ (2003). Selective cognitive dysfunction in acetylcholine M1 muscarinic receptor mutant mice. Nat Neurosci 6:51–58.
- Ayuso-Gutiérrez JL, delRío Vega JM. (1997). Factors influencing relapse in the long-term course of schizophrenia. Schizophr Res.; 28(2–3):199–206.
- Baldessarini RJ (2001). Drugs and the treatment of psychiatry and mania. In: Hardman JG, Limbird IE (eds) Goodman and Gilman, the pharmacological basis of therapeutics, 10th edn. McGraw-Hill, New York, pp 175–191;
- Bezchlibnyk-Butler K, Jeffries J and Virani A (2009). Clinical Handbook of Psychotropic Drugs: Hogrefe and Huber Publishers.
- Creese, I., Burt, DR., Snyder, SH. (1976). DA receptor binding predicts clinical and pharmacological potencies of antischizophrenic drugs. Science, 192:.481-483.

- Crook JM, Tomaskovic-Crook E, Copolov DL, Dean B. (2000). Decreased muscarinic receptor binding in subjects with schizophrenia: a study of the human hippocampal formation. *Biol Psychiatry* 48(5):381-388.
- Davis KL, Kahn RS, Grant KO, Davidson M. (1991). Dopamine in schizophrenia: a review and reconceptualization. *Am J Psychiat* 148:1474–1486.
- Dean B, Crook JM, Opeskin K, Hill C, Keks N, Copolov DL. (1996). The density of muscarinic M1 receptors is decreased in the caudate-putamen of subjects with schizophrenia. *Mol Psychiatry* 1(1):54-58.
- Ebert U, Kirch W. (1998). Scopolamine model of dementia: electroencephalogram findings and cognitive performance. *Eur J Clin Invest* 28:944–949.
- Ellman, G. L.; Courtney, D.K.; Andres, V.; Featherstone, R.M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*, 7, 88–95.
- Everitt BJ, Robbins TW (1997). Central cholinergic systems and cognition. *Annu Rev Psychol* 48:649–684.
- Fachinetto, R.; Burger, ME.; Wagner, C.; Wondracek, DC.; Brito VB.; Nogueira CW.; Ferreira, J et al. (2005). High fat diet increases the incidence of orofacial dyskinesia and oxidative stress in specific brain regions of rats. *PharmacolBiochemBehav*, v.81, n.3, p.585-592.
- Feldman HH, Ferris S, Winblad B, Sfikas N, Mancione L, He Y, Tekin S. et al. (2007). Effect of rivastigmine on delay to diagnosis of Alzheimer's disease from mild cognitive impairment: the InDDEx study. *Lancet Neurol* 6(6):501-512.

- Fink-Jensen, A; Schmidt, LS; Dencker, D; Schülein, C; Wess, J; Wörtwein, G; Woldbye, DPD. (2011). Antipsychotic-induced catalepsy is attenuated in mice lacking the M4 muscarinic acetylcholine receptor. *European Journal of Pharmacology*, 656:39–44.
- Forette F, Anand R, Gharabawi G. (1999). A phase II study in patients with Alzheimer's disease to assess the preliminary efficacy and maximum tolerated dose of rivastigmine (Exelon). *Eur J Neurol* 6(4):423-429.
- Foster DJ, Jones CK, Conn PJ. (2012). Emerging approaches for treatment of schizophrenia: modulation of cholinergic signaling. *Discov Med.*;14(79):413-20.
- Goverdhan P, Sravanthi A, Mamatha T. (2012). Neuroprotective effects of meloxicam and selegiline in scopolamine-induced cognitive impairment and oxidative stress. *International Journal of Alzheimer's Disease*. Volume 2012, Article ID 974013, 8 pages.
- Grisaru D, Sternfeld M, Eldor A, Glick D, Soreq H.(1999). Structural roles of acetylcholinesterase variants in biology and pathology. *Eur J Biochem*. Sep;264(3):672-86.
- Grünblatt, E. et al. (2000). Neuroprotective strategies in parkinsons disease using the models of 6-hydroxydopamine and MPTP. *Ann NY Acad. Sci.* (899): 262-73.
- Haleem, D. J., Shireen, E. e Haleem, M. A., (2004). Somatodendritic and postsynaptic serotonin-1A receptors in the attenuation of haloperidol-induced catalepsy. *ProgNeuropsychopharmacolBiolPsychiatry* 28, 1323-1329.
- Ikarashi Y, Takahashi A, Ishimaru H, Arai T, Maruyama Y. (1997). Regulation of Dopamine D1 and D2 Receptors on Striatal Acetylcholine Release in Rats. *Brain Research Bulletin*, Volume 43, Issue 1, Pages 107–115.
- Kerwin RW, Osborne S. (2000). Antipsychotic drugs. *Medicine*. 2000;28:23–25.

- Leucht S, Komossa K, Rummel-Kluge C, et al. (2009). A meta-analysis of head-to-head comparisons of second-generation antipsychotics in the treatment of schizophrenia. *Am J Psychiatry*. 166(2):152–163.
- Lieberman JA, Tollefson G, Tohen M, et al. (2003). Comparative efficacy and safety of atypical and conventional antipsychotic drugs in first-episode psychosis: a randomized, double-blind trial of olanzapine versus haloperidol. *Am J Psychiatry*. 160(8):1396–1404.
- Lisman JE, Coyle JT, Green RW, Javitt DC, Benes FM, Heckers S, Grace AA (2008). Circuit-based framework for understanding neurotransmitter and risk gene interactions in schizophrenia. *Trends Neuroscience* 31(5):234-242.
- Liu-Seifert H, Adams DH, Kinon BJ. (2005). Discontinuation of treatment of schizophrenic patients is driven by poor symptom response: a pooled post-hoc analysis of four atypical antipsychotic drugs. *BMC Med.*;3:21.
- Marin O. (2012). Interneuron dysfunction in psychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci* 13(2):107-120.
- McCreddie RG, Srinivasan TN, Padmavati R, Thara R. (2005). Extrapyramidal symptoms in unmedicated schizophrenia. *J Psychiatr Res.*;39 (3):261–266.
- Miyamoto S, Duncan GE, Marx CE, Lieberman JA. (2005). Treatments for schizophrenia: a critical review of pharmacology and mechanisms of action of antipsychotic drugs. *Mol Psychiatry*; 10(1):79–104.
- Mullen PE (2006). Schizophrenia and violence: from correlations to preventive strategies. *Adv Psychiat Treat* 12:239–248.

- Nemeroff CB, Kinkead B, Goldstein J. (2002). Quetiapine: preclinical studies, pharmacokinetics, drug interactions, and dosing. *J Clin Psychiatry*; 63 Suppl 13:5–11.
- Nielsen RE, Nielsen J. (2009). Antipsychotic drug treatment for patients with schizophrenia: theoretical background, clinical considerations and patient preferences. *Clin Med Ther.*; 1:1053–1068.
- Noetzel MJ, Jones CK, Conn PJ. (2012). Emerging approaches for treatment of schizophrenia: modulation of glutamatergic signaling. *Discov Med* 14(78):335-343.
- Ray WA, Chung CP, Murray KT, Hall K, Stein CM (2009). Atypical antipsychotic drugs and the risk of sudden cardiac death. *N Engl J Med* 360:225–235.
- Rocha, J.B.T.; Emanuelli, T.; Pereira, M.E. (1993). Effects of early undernutrition on kinetic parameters of brain acetylcholinesterase from adult rats. *ActaNeurobiol. Exp.*, 53, 431–437.
- Sarter M, Lustig C, Taylor SF. (2012). Cholinergic contributions to the cognitive symptoms of schizophrenia and the viability of cholinergic treatments. *Neuropharmacology* 62(3):1544-1553.
- Singla, A.K., Chawla, M., Singh, A., (2000). Nimesulide: some pharmaceutical and pharmacological aspects—an update. *Pharm. Pharmacol.* 52, 467–486.
- Soreq H, Seidman S. (2001). Acetylcholinesterase--new roles for an old actor. *Nat Rev Neurosci.* Apr;2(4):294-302.
- Stahl, Stephen M. (2011). *Psychopharmacology: neuroscientific basis and practical applications*. 3th ed. England.

- Sugino H. et al. (2009). Atypical antipsychotics suppress production of proinflammatory cytokines and up-regulate interleukin-10 in lipopolysaccharide-treated mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 33(2):303-7.
- Suleyman H, Cadirci E, Albayrak A, et al. (2008) Nimesulide is a selective COX-2 inhibitory, atypical non-steroidal anti-inflammatory drug. *Curr Med Chem*.;15:278–283.
- Yakel LJ. (2013). Cholinergic receptors: functional role of nicotinic ACh receptors in brain circuits and disease. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*.
- Yu D, Dayan P. (2002). Acetylcholine in cortical inference. *Neural network*. 2002; 15: 719–730.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by Committee for the Development of Higher Education

Personal – CAPES and UFPEL.

Legends

Fig. 1: Effect the haloperidol and nimesulida in spontaneous locomotor activity. Data expressed as mean $\pm$ SEM. *P < 0.05, ANOVA/DUNCAN. N = 8-10. G1A: saline X saline; G1B: saline X nimesulide; G2A: tween X nimesulide; G3A: haloperidol 7 mg/kg X saline; G3B: haloperidol 14 mg/kg X nimesulide; G4A: haloperidol 14 mg/kg X saline; G4B: haloperidol 14 mg/kg X nimesulide.

Fig. 2: Effect of haloperidol and nimesulide on number of defecations (fecal bolus) during Spontaneous Locomotor Activity in the different groups. Data expressed as mean $\pm$ SEM. *P < 0.01, ANOVA/DUNCAN. N = 8-10. G1A: saline X saline; G1B: saline X nimesulide; G2A: tween X nimesulide; G3A: haloperidol 7 mg/kg X saline; G3B: haloperidol 14 mg/kg X nimesulide; G4A: haloperidol 14 mg/kg X saline; G4B: haloperidol 14 mg/kg X nimesulide.

Fig. 3: Effect the haloperidol in cataleptic activity of animals in different groups. Data expressed as mean $\pm$ SEM. P < 0.05, repeated measures ANOVA/DUNCAN. N = 8-10. G1A: saline X saline; G1B: saline X nimesulide; G2A: tween X nimesulide; G3A: haloperidol 7 mg/kg X saline; G3B: haloperidol 14 mg/kg X nimesulide; G4A: haloperidol 14 mg/kg X saline; G4B: haloperidol 14 mg/kg X nimesulide.

Fig. 4: Acetylcholinesterase activity in different brain structures was expressed in μmol AcSCh/h/mg of protein. The animals were treated with G1A: saline X saline; G1B: saline X nimesulide; G2A: tween X nimesulide; G3A: haloperidol 7 mg/kg X saline; G3B: haloperidol 14 mg/kg X nimesulide; G4A: haloperidol 14 mg/kg X saline; G4B: haloperidol 14 mg/kg X nimesulide. In figure A prefrontal cortex was analysed *Different from the others groups not

marked with asterisks (ANOVA/DUNCAN $P = 0.008$, $N = 4-5$). There was not difference between groups One-way ANOVA $P = 0.764$ for striatum and $P = 0.058$ for hippocampus.

FIGURES

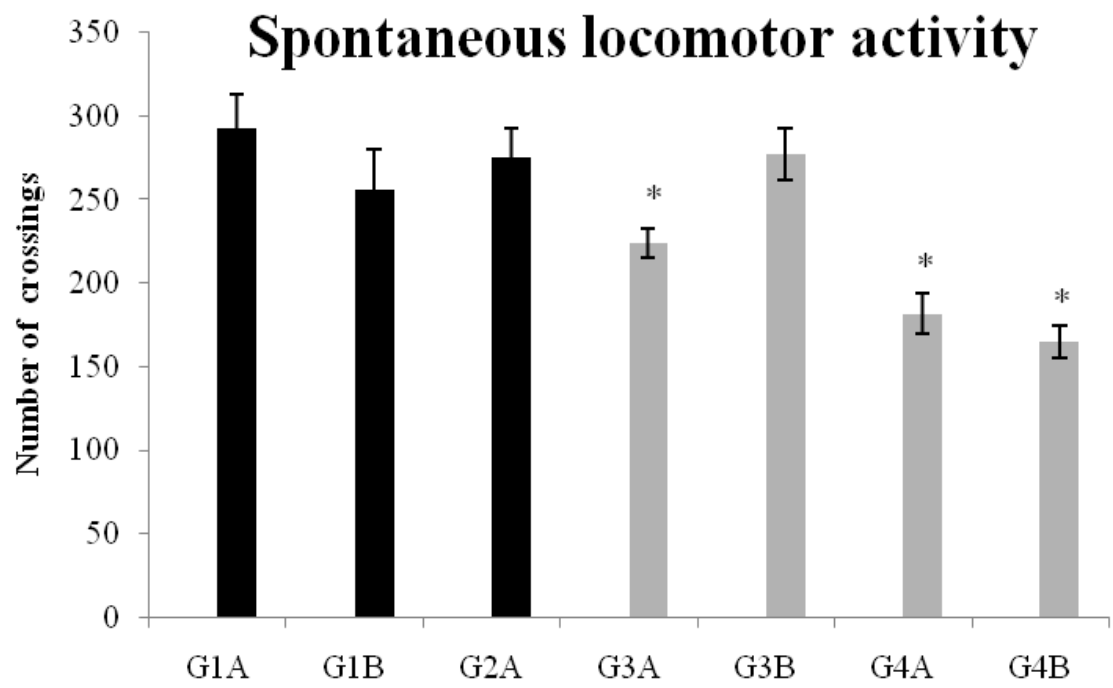


Figure 1.

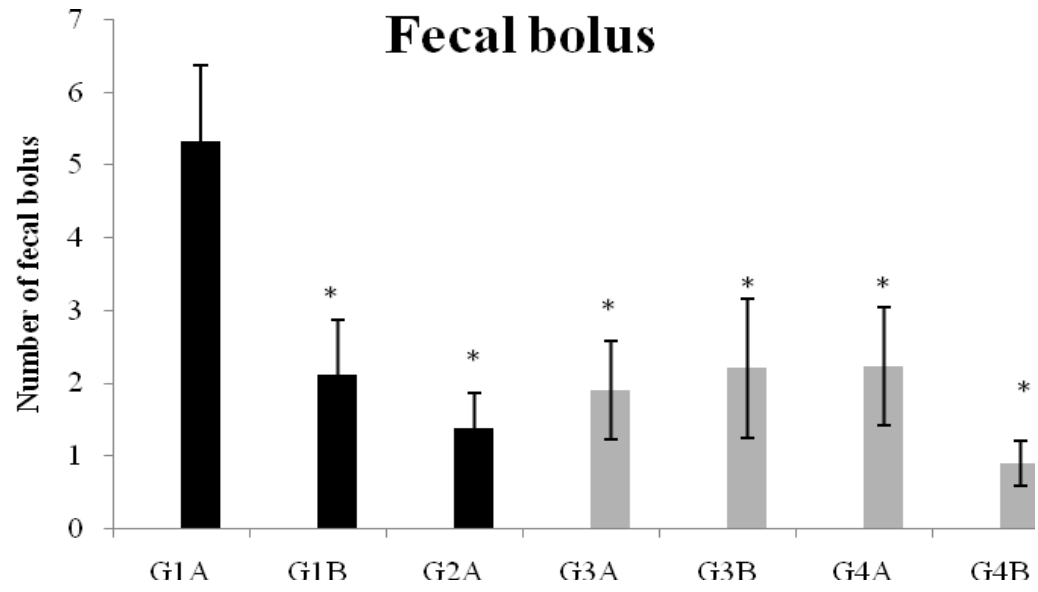


Figure 2.

Catalepsy

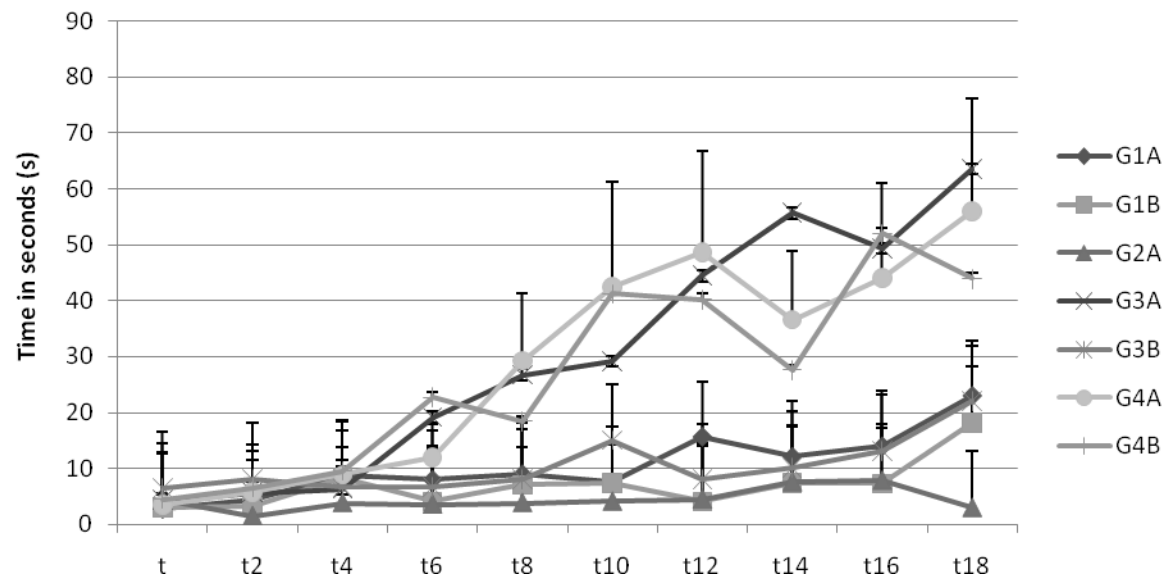
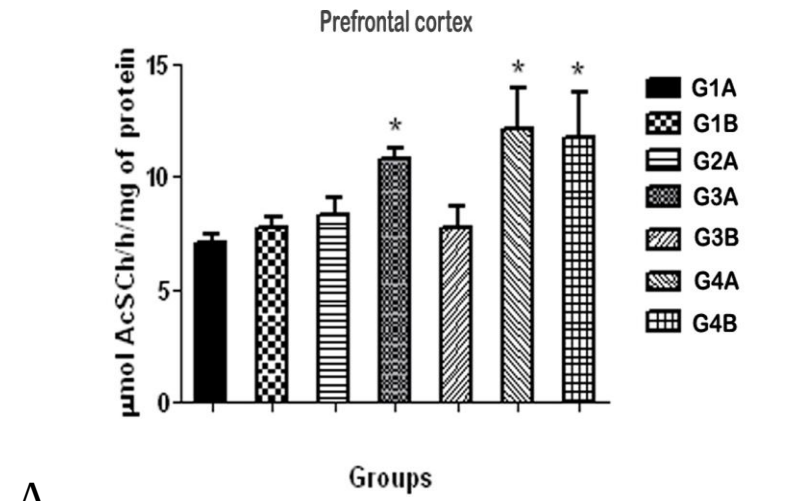
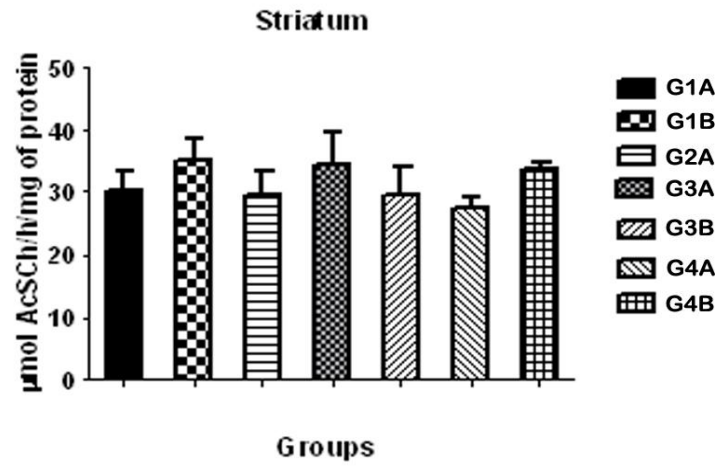


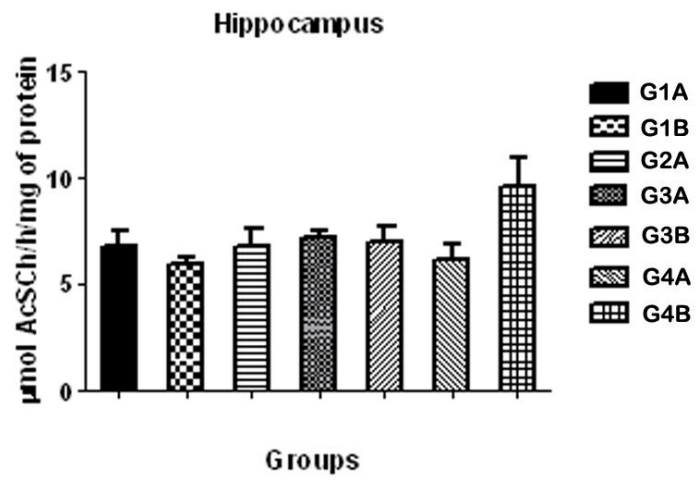
Figure 3.



A



B



C

Figure 4

5 Conclusões

De acordo com os objetivos deste trabalho, e frente aos resultados, pode-se verificar que:

- A administração crônica de haloperidol confirmou os efeitos colaterais - diminuição da atividade locomotora e aumento da catalepsia - em todos os grupos na presença do antipsicótico;
- O anti-inflamatório nimesulida reverteu estes efeitos nos grupos com haloperidol na menor dose de 7 mg/kg, sugerindo a possível ação do anti-inflamatório apenas na dose correspondente à terapêutica;
- O haloperidol aumentou a atividade da enzima AChE somente no córtex pré-frontal, não apresentando diferença nas outras estruturas avaliadas. A administração de nimesulida reverteu a ação do haloperidol 7 mg/kg, indicando novamente a interferência da nimesulida apenas na dose terapêutica;
- Nossos dados sugerem uma possível influência da Nimesulida na atividade colinérgica e na reversão dos efeitos extrapiramidais causados pelo Haloperidol.

Referências Bibliográficas

AL-AYADHI, L.Y. , MOSTAFA, G.A. A falta de associação entre elevação dos níveis séricos de S100B proteína e autoimunidade em crianças autistas. **Journal Neuroinflammation**. v. 9, p. 54, 2012.

AKBARIAN, S., KIM, J.J., POTKIN, S.G., et al.. Gene expression for glutamic acid decarboxylase is reduced without loss of neurons in prefrontal cortex of schizophrenics. **Archives of General Psychiatry**, v. 52, p. 258–266, 1995.

AKHONDZADEH, S., TABATABAEE, M., AMINI, H., AHMADI ABHARI, S.A., ABBASI, S.H., BEHNAM, B. Celecoxib as adjunctive therapy in schizophrenia: a double-blind, randomized and placebo-controlled trial. **Schizophrenia Research**, v. 90, p.179–85, 2007.

AKBARIAN, S., KIM, J.J., POTKIN, S.G., et al. Gene expression for glutamic acid decarboxylase is reduced without loss of neurons in prefrontal cortex of schizophrenics. **Archives of General Psychiatry**, v. 52, p. 258–266, 1995.

ALEMAN, A., KAHN, R.S., SELTEN, J.P. Sex differences in the risk of schizophrenia: evidence from meta-analysis. **Archives of General Psychiatry**, v. 60, n.6, p. 565–571, 2003.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders**. Washington DC., 4th ed., p. 866, 1994.

AOSAKI, T., MIURA, M., SUZUKI, T., NISHIMURA, K., MASUDA, M. Acetylcholine dopamine balance hypothesis in the striatum: an update. **Geriatrics & Gerontology**, v. 10, p.48 and 157, 2010.

ARION, D., UNGER, T., LEWIS, D.A., LEVITT, P., MIRNICS, K. Molecular evidence for increased expression of genes related to immune and chaperone function in the prefrontal cortex in schizophrenia. **Biological Psychiatry**, v. 62, p. 711–21, 2007.

AYUSO-GUTIÉRREZ, J.L., DEL RÍO VEGA, J.M. Factors influencing relapse in the long-term course of schizophrenia. **Schizophrenia Research**, v. 28, n. 2–3, p. 199–206, 1997.

BREIER, A., BERG, P.H. The psychosis of schizophrenia: prevalence, response to atypical antipsychotics, and prediction of outcome. **Biological Psychiatry**, v. 46, n. 3, p. 361–364, 1999.

BROWN, A.S. Prenatal infection as a risk factor for schizophrenia. **Schizophrenia Bulletin**, v. 32, p. 200–2, 2006.

BROWN, A. S. & DERKITS, E. J. Prenatal infection and schizophrenia: a review of epidemiologic and translational studies. **American Journal of Psychiatry**, v. 167, p. 261–280, 2010.

BUCKLEY, P.F. Treatment of schizophrenia: let's talk dollars and sense. **American Journal of Managed Care**, v. 4, n. 3, p.:369–383, 1998.

BYMASTER, F.P., MCKINZIE, D.L., FELDER, C.C., WESS, J. Use of M1–M5 muscarinic receptor knockout mice as novel tools to delineate the physiological roles of the muscarinic cholinergic system. **Neurochemistry Research**, v. 28, p. 437–442, 2003.

CANNON, M., JONES, P. B. & MURRAY, R. M. Obstetric complications and schizophrenia: historical and meta-analytic review. **American Journal of Psychiatry**, v. 159, p. 1080–1092, 2002.

CARDNO, A. G. et al. Heritability estimates for psychotic disorders: the Maudsley twin psychosis series. **Archives of General Psychiatry**, v. 56, p. 162–168, 1999.

CARLSSON, A. The current status of the dopamine hypothesis of schizophrenia. **Neuropsychopharmacology**, v. 1, p. 179–186, 1988.

CASEY, D.E. Tardive dyskinesia and atypical antipsychotic drugs. **Schizophrenia Research**, v. 35, p. 61–66, 1999.

COSTALL, B.; NAYLOR, R. J. On catalepsy and catatonia and the predictability of the catalepsy test for neuroleptic activity. **Psychopharmacologia**, v. 34, p. 233–241, 1971.

CURKENDALL, S.M., MO, J., GLASSER, D.B., ROSE, S.M., JONES, J.K. Cardiovascular disease in patients with schizophrenia in Saskatchewan, Canada. **Journal Clinical Psychiatry**, v. 65, p. 715–720, 2004.

DAMSMA, G., DE BOER, P., WESTERINK, B.H., FIBIGER, H.C. Dopaminergic regulation of striatal cholinergic interneurons: an in vivo microdialysis study. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 342, p. 523–527, 1990.

DEBOER, P., ABERCROMBIE, E.M. Physiological release of striatal acetylcholine in vivo: modulation by D1 and D2 dopamine receptor subtypes. **The Journal of Pharmacology And Experimental Therapeutics**, v. 277, p. 775–783, 1996.

DI CHIARA, G., MORELLI, M., CONSOLO, S. Modulatory functions of neurotransmitters in the striatum: ACh/dopamine/NMDA interactions. **Trends in Neuroscience**, v. 17, p. 228–233, 1994.

DOGAN, M.D., ATAOGU, H., AKARSU, E.S. Nimesulide and diclofenac inhibit lipopolysaccharide-induced hypothermia and tumour necrosis factor- α elevation in rats. **Fundamental Clinical Pharmacology**, v. 16, p. 303–309, 2002.

ELLMAN, L. M. et al. Structural brain alterations in schizophrenia following fetal exposure to the inflammatory cytokine interleukin-8. **Schizophrenia Research**, v. 121, p. 46–54, 2010.

ENGER, C., WEATHERBY, L., REYNOLDS, R.F., GLASSER, D.B., WALKER, A.M. Serious cardiovascular events and mortality among patients with schizophrenia. **The Journal of Nervous and Mental Disease**, v. 1921, p.19–27, 2004.

FAN, X., GOFF, D.C. AND HENDERSON, D.C. Inflammation and schizophrenia. **Expert Review of Neurotherapeutics**, v. 7, p. 789–796, 2007.

FELLERHOFF, B., LAUMBACHER, B., MUELLER, N., GU SWANK, R. Associations between Chlamydia infections, schizophrenia and risk of HLA-A10. **Molecular Psychiatry** v. 12, p. 264–72, 2007.

FINK-JENSEN, A., SCHMIDT, L.S., DENCKER, D., SCHÜLEIN, C., WESS, J., WÖRTWEIN, G., WOLDBYE, D.P. Antipsychotic-induced catalepsy is attenuated in mice lacking the M4 muscarinic acetylcholine receptor. **European Journal Pharmacology**, v. 656, n. 1-3, p. 39-44, 2011.

FOUSSIAS, G., REMINGTON, G. Negative symptoms in schizophrenia: avolition and Occam's razor. **Schizophrenia Bulletin**; v. 36, n. 2, p. 359–369, 2010.

GALLETLY, C. Recent advances in treating cognitive impairment in schizophrenia. **Psychopharmacology**, v. 202, p. 259–273, 2009.

HARVEY, P.D., RABINOWITZ, J., EERDEKENS, M., DAVIDSON, M. Treatment of cognitive impairment in early psychosis: a comparison of risperidone and haloperidol in a large long-term trial. **American Journal of Psychiatry**, v. 162, n. 10, p. 1888–1895, 2005.

HENNEKENS, C.H., HENNEKENS, A.R., HOLLAR, D., CASEY, D.E. Schizophrenia and increased risks of cardiovascular disease. **American Heart Journal**, v. 1506, p. 1115–21, 2005.

HIKIDA, T., KITABATAKE, Y., PASTAN, I., NAKANISHI, S. Acetylcholine enhancement in the nucleus accumbens prevents addictive behaviors of cocaine and morphine. **Proceeding of the National Academic of Science of the United States of American**, v. 100, p. 6169 and 6173, 2003.

HOEBEL, B.G.; AVENA, N.M.; RADA, P. Accumbens dopamine-acetylcholine balance in approach and avoidance. **Current. Opinion in Pharmacology**, n. 7, p. 617 and 627, 2007.

HOFFMAN, D.C.; DONOVAN, H. Catalepsy as a rodent model for detecting antipsychotic-drugs with extrapyramidal side-effect liability. **Psychopharmacology**, n. 120, p. 128–133, 1995.

HOWES, O.D.; FUSAR-POLI, P.; BLOOMFIELD, M., et al.. From the prodrome to chronic schizophrenia: The neurobiology underlying psychotic symptoms and cognitive impairments. **Current Pharmaceutical Design**, n.18, p. 459–465, 2005.

INSEL, T.R. Rethinking schizophrenia. **Nature**, v. 468, n. 7321, p.187-93, 2010.

KANE, J., HONIGFELD, G., SINGER, J., MELTZER, H. Clozapine for the treatment-resistant schizophrenic: a double-blind comparison with chlorpromazine. **Archive of General Psychiatry**, v. 45, p. 789-96, 1988.

KANE, J.M., WOERNER, M., LIEBERMAN, J. Epidemiological aspects of tardive dyskinesia. **Encephale**, v. 14, p. 191–194, 1988.

KARAM, C.S. et al. Signaling pathways in schizophrenia: emerging targets and therapeutic strategies. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 31, p. 381-390, 2010.

KATZENSCHLAGER, R., SAMPAIO, C., COSTA, J., LEES, A. Anticholinergics for symptomatic management of Parkinson's disease. **Cochrane Database System Review**, v. 2, CD003735, 2003.

KERWIN, R.W., OSBORNE, S. Antipsychotic drugs. **Medicine**, v. 28, p. 23–25, 2000.

KESHAVAN, M.S., TANDON, R., BOUTROS, N.N., NASRALLAH, H.A. Schizophrenia, “just the facts”: what we know in 2008 Part 3: neurobiology. **Schizophrenia. Research**, v. 106, n. 2–3, p. 89–107, 2008.

KETY, S. S. The significance of genetic factors in the etiology of schizophrenia: results from the national study of adoptees in Denmark. **Journal Psychiatric. Research**, v. 21, p. 423–429, 1987.

KITAMURA, T., OKAZAKI, Y., FUJINAWA, A., TAKAYANAGI, I., KASAHARA, Y. Dimensions of schizophrenic positive symptoms: an exploratory factor analysis investigation. **European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience**, v. 248, n. 3, p.130–135, 1998.

KLEMM, W.R. Evidence for a cholinergic role in haloperidol-induced catalepsy. **Psychopharmacology**, v. 85, p. 139–142, 1985.

KRAEPELIN, E., BARCLAY, R.M., ROBERTSON, G.M. Dementia praecox and paraphrenia. **Edinburgh: E&S Livingstone**, 1919.

LE MOINE, C., TISON, F., BLOCH, B. D2 dopamine receptor gene expression by cholinergic neurons in the rat striatum. **Neuroscience Letters**, v. 117, p. 248–252, 1990.

LEUCHT, S., KOMOSSA, K., RUMMEL-KLUGE, C., et al. A meta-analysis of head-to-head comparisons of second-generation antipsychotics in the treatment of schizophrenia. **American Journal of Psychiatry**, v. 166, n. 2, p. 152–163, 2009.

LEVEY, A.I. Immunological localization of m1–m5 muscarinic acetylcholine receptors in peripheral tissues and brain. **Life Science**, v. 52, p. 441–448, 1993.

LEWIS, D.A., HASHIMOTO, T., VOLK, D.W. Cortical inhibitory neurons and schizophrenia. **Nature Review Neuroscience**, v. 6, p. 312–324, 2005.

LIEBERMAN, J.A., TOLLEFSON, G., TOHEN, M., et al. Comparative efficacy and safety of atypical and conventional antipsychotic drugs in first-episode psychosis: a randomized, double-blind trial of olanzapine versus haloperidol. **American Journal of Psychiatry**, v. 160, n. 8, p. 1396–1404, 2003.

LIDDLE, P.F. The symptoms of chronic schizophrenia. A re-examination of the positive negative dichotomy. **British Journal of Psychiatry**, v. 151, p. 145-151, 1987.

MCCREADIE, R.G., SRINIVASAN, T.N., PADMAVATI, R., THARA, R. Extrapyramidal symptoms in unmedicated schizophrenia. **Journal Psychiatric Research**, v. 39, n. 3, p. 261–266, 2005.

MCGUFFIN, P. & GOTTESMAN, I. I. Risk factors for schizophrenia. **New England Journal Medicine**, v. 341, p. 370–372, 1999.

MELNIKOVA, T., SAVONENKO, A., WANG, Q., LIANG, X., HAND, T., WU, L., et al. Cyclooxygenase-2 activity promotes cognitive deficits but not increased amyloid burden in a model of Alzheimer's disease in a sex-dimorphic pattern. **Neuroscience**, v. 141, p. 1149–1162, 2006.

MELTZER, H.Y., MCGURK, S.R. The effects of clozapine, risperidone, and olanzapine on cognitive function in schizophrenia. **Schizophrenia Bulletin** v. 25, p.233–255, 1999.

MESULAM, M.M., GUILLOZET, A., SHAW, P., LEVEY, A., DUYSSEN, E.G., LOCKRIDGE, O. Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. **Neuroscience**, v. 110, n. 4, p. 627-39, 2002.

MIFSUD, J.C., HERNANDEZ, L., HOEBEL, B.G. Nicotine infused into the nucleus accumbens increases synaptic dopamine as measured by in vivo microdialysis. **Brain Research**, v. 478, n. 2, p. 365 and 367.

MIYAMOTO, S., DUNCAN, G.E., MARX, C.E., LIEBERMAN, J.A. Treatments for schizophrenia: a critical review of pharmacology and mechanisms of action of antipsychotic drugs. **Molecular Psychiatry**, v.10, n. 1, p. 79–104, 2005

MULLER, N., HOFSCHUSTER, E., ACKENHEIL, M., ECKSTEIN, R. T-cells and psychopathology in schizophrenia: relationship to the outcome of neuroleptic therapy. **Acta Psychiatrica Scandinavica**, v. 87, p. 66–71, 1993.

MÜLLER, N., RIEDEL, M., SCHWARZ, M.J., ENGEL, R.R.. Clinical effects of COX-2 inhibitors on cognition in schizophrenia. **European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience**, v. 255, p. 149–51, 2005.

MÜLLER, N., SCHWARZ, M.J. The immune-mediated alteration of serotonin and glutamate: towards an integrated view of depression. **Molecular Psychiatry**, v. 12, n. 11, p. 988-1000, 2007.

_____. The immunological basis of glutamatergic disturbance in schizophrenia: towards an integrated view. **Journal of Neural Transmission**, v. 72, p. 269-80, 2007.

MIYAMOTO, S., DUNCAN, G.E., MARX, C.E., LIEBERMAN, J.A. Treatments for schizophrenia: a critical review of pharmacology and mechanisms of action of antipsychotic drugs. **Molecular Psychiatry**, v. 10, p. 79-104, 2005.

OSBY, U., CORREIA, N., BRANDT, L., EKBOM, A., SPAREN, P. Mortality and causes of death in schizophrenia in Stockholm County, Sweden. **Schizophrenia Research**, v. 451, n. 2, p. 21–8, 2000.

PERKINS, D.O., GU, H., BOTEVA, K., LIEBERMAN, J.A. Relationship between duration of untreated psychosis and outcome in first-episode schizophrenia: a critical review and meta-analysis. **American Journal Psychiatry**, v. 162, n. 10, p. 1785–1804, 2005.

PERRY, E., WALKER, M., GRACE, J., PERRY, R. Acetylcholine in mind: A neurotransmitter correlate of consciousness? **Trend Neuroscience**, v. 22, p. 273–280, 1999.

POTVIN, S., STIP, E., SEPEHRY, A.A., GENDRON, A., BAH, R., KOUASSI, E. Inflammatory cytokine alterations in schizophrenia: a systematic quantitative review. **Biological Psychiatry**, v. 63, p. 801–8, 2008.

RAINSFORD, K.D. Current status of the therapeutic uses and actions of the preferential cyclo-oxygenase-2 NSAID, nimesulide. **Inflammopharmacology**, v. 14, n. 3-4, p. 120-37, 2006.

_____. Members of the Consensus Report Group on Nimesulide. Nimesulide – a multifactorial approach to inflammation and pain: scientific and clinical consensus. **Current Medical Research & Opinion**, v. 22, p. 1161–1170, 2006.

RAY, W.A., CHUNG, C.P., MURRAY, K.T., HALL, K., STEIN, C.M. Atypical antipsychotic drugs and the risk of sudden cardiac death. **New England Journal Medicine**, v. 360, p. 225–235, 2009.

RICE, D.P. The economic impact of schizophrenia. **Journal Clinical Psychiatry**, v. 60 p. 28–30, 1999.

ROBERTSON, G.S., VINCENT, S.R., FIBIGER, H.C. D1 and D2 dopamine receptors differentially regulate c-fos expression in striatonigral and striatopallidal neurons. **Neuroscience**, v. 49, p. 285–296, 1992.

SAETRE, P., EMILSSON, L., AXELSSON, E., KREUGER, J., LINDHOLM, E., JAZIN, E. Inflammation-related genes up-regulated in schizophrenia brains. **BMC Psychiatry**, v. 7, p. 46., 2007.

SAWA, A., SNYDER, SH. Schizophrenia: neural mechanisms for novel therapies. **Molecular Medicine**, v. 9, n. 1-2, p. 3-9, 2003.

SAYKIN, A.J., GUR, R.C., GUR, R.E., et al. Neuropsychological function in schizophrenia. Selective impairment in memory and learning. **Archive General Psychiatry**, v. 48, n. 7, p. 618–624, 1991.

SINGLA, A.K., CHAWLA, M., SINGH, A. Nimesulide: some pharmaceutical and pharmacological aspects—an update. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.52, p. 467–486, 2000.

SOREQ, H; SEIDMAN, S. Acetylcholinesterase – new roles for na old actor. **Nature Reviews in Neuroscience**, v. 2, p. 294-302, 2001.

SOUZA, D.F., WARTCHOW, K., HANSEN, F., LUNARDI, P., GUERRA, M.C., NARDIN, P., GONÇALVES, C.A. Interleukin-6-induced S100B secretion is inhibited by haloperidol and risperidone. **Neuropsychopharmacology Biological Psychiatry**, v. 43, p. 14-22, 2012.

ST CLAIR, D. et al. Rates of adult schizophrenia following prenatal exposure to the Chinese famine of 1959–1961. **Journal American Medical Association**, v. 294, p. 557–562, 2005.

SULEYMAN, H., CADIRCI, E., ALBAYRAK, A. et al. Nimesulide is a selective COX-2 inhibitory, atypical non-steroidal anti-inflammatory drug. **Current Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 278–283, 2008.

SUSSER, E. S. & LIN, S. P. Schizophrenia after prenatal exposure to the Dutch Hunger Winter of 1944–1945. **Archive General Psychiatry**, v. 49, p. 983–988 199.

SWERDLOW, N.R., VAN BERGEIJK, D.P., BERGSMA, F., WEBER, E., TALLEDO, J. The effects of memantine on prepulse inhibition. **Neuropsychopharmacology**, v. 34, p. 1854–64, 2009.

TAMMINGA, C.A., WOERNER, M.G. Clinical course and cellular pathology of tardive dyskinesia. **American College of Neuropsychopharmacology**, p. 1831–1841, 2002.

TANDON, R., NASRALLAH, H.A., KESHAVAN, M.S. Schizophrenia, “just the facts” 4. Clinical features and conceptualization. **Schizophrenia Research**, v. 110, n. 1–3, p. 1–23, 2009.

TANDON, R. Antipsychotics in the treatment of schizophrenia: an overview. **Journal Clinical Psychiatry**, v. 72, n. 1, p. 4-8, 2011.

TASSORELLI, C., GRECO, R., SANDRINI, G., et al. Central components of the analgesic/antihyperalgesic effect of nimesulide: studies in animal models of pain and hyperalgesia. **Drugs**, v. 63, p. 9–22, 2003.

TEIXEIRA, A.L., REIS, H.J., NICOLATO, R., BRITO-MELO, G., CORREA, H., TEIXEIRA, M.M., et al. Increased serum levels of CCL11/eotaxin in schizophrenia. **Program Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 32, p. 710–714, 2008.

TERRY, A.V. Role of the central cholinergic system in the therapeutics of schizophrenia. **Current Neuropharmacology**, v. 6, p. 286–292, 2008.

VILARO, M.T., MENGOD, G., PALACIOS, J.M. Advances and limitations of the molecular neuroanatomy of cholinergic receptors: the example of multiple muscarinic receptors. **Program Brain Research**, v. 98, p. 95–101, 1993.

ZALCMAN, S., MURRAY, L., DYCK, D.G., GREENBERG, A.H., NANCE, D.M. Interleukin-2 and -6 induce behavioral-activating effects in mice. **Brain Research**, v. 811, p.111–112, 1998.

WALKER, A.M., LANZA, L.L., ARELLANO, F., ROTHMAN, K.J. Mortality in current and former users of clozapine. **Epidemiology**, v. 86, p. 671–677, 1997.

WESS, J. Muscarinic acetylcholine receptor knockout mice: novel phenotypes and clinical implications. **Annual. Reviews of Pharmacology and Toxicology**, v. 44, p. 423–450, 2004.

WINKLER, J., SUHR, S.T., GAGE, F.H., THAL, L.J., FISHER, L.J. Essential role of neocortical acetylcholine in spatial memory. **Nature**, v. 375, p. 484–487, 1995.