



Andreia Sofia Pereira Diniz

# ALTERAÇÕES FENOTÍPICAS E FUNCIONAIS NAS DIFERENTES POPULAÇÕES DE MONÓCITOS E CÉLULAS DENDRÍTICAS NO SANGUE PERIFÉRICO EM ESQUIZOFRENIA

Dissertação realizada no âmbito do Mestrado em Bioquímica, sob orientação do Professor Doutor Artur Augusto Paiva e coorientação da Professora Doutora Paula Cristina Veríssimo Pires, apresentada à Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

Agosto de 2017



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Departamento de Ciências da Vida  
Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de  
Coimbra

**Alterações fenotípicas e funcionais nas diferentes populações  
de monócitos e nas células dendríticas no sangue periférico em  
Esquizofrenia**

**Phenotypical and functional alterations of different peripheral  
blood populations of monocytes and dendritic cells in  
schizophrenia.**

Andreia Sofia Pereira Diniz



This work was financed by the European Regional Development Fund (ERDF) through the COMPETE 2020 - Operational Programme for Competitiveness and Internationalisation and Portuguese national funds via FCT – Fundação para a Ciência e a Tecnologia, I.P., under projects: POCI-01-0145-FEDER-007440, POCI-01-0145-FEDER-016428, PTDC/NEU-SCC/7051/2014 and POCI-01-0145-FEDER-016795; and by The National Mass Spectrometry Network (RNEM) under the contract REDE/1506/REM/2005. Cátia Santa was supported by PhD fellowship SFRH/BD/88419/2012, cofunded by the European Social Fund (ESF) through the POCH - Programa Operacional do Capital Humano and national funds via FCT.



## AGRADECIMENTOS

Contrariamente ao que se pensa, fazer uma tese de investigação e escrever uma dissertação não é um processo solitário, exige o trabalho e o contributo de várias pessoas. Felizmente desde o princípio do ano lectivo que contei com o apoio e confiança de muitas pessoas e de várias instituições.

Ao Professor Doutor Artur Paiva, orientador da dissertação, agradeço o seu apoio, motivação, sabedoria e as mais valiosas contribuições para o trabalho.

À Professora Doutora Paula Veríssimo por estar sempre disponível para me tirar dúvidas e por fazer sempre o melhor pelos seus alunos.

Ao Doutor Buno Manadas pela oportunidade de participar neste projecto.

Aos médicos Doutor Nuno Madeira e Doutor Manuel Coroa que foram fundamentais para o desenvolvimento deste estudo e por estarem sempre disponíveis para me ajudarem. À Doutora Sofia Morais pelo seu contributo, bem como a toda a equipa de enfermagem dos Hospitais da Universidade de Coimbra e Sobral Cid que prescindiram do seu tempo para a realização deste trabalho.

Às minhas colegas da UGOC, Susana Pedreiro, Helena Carvalheiro, Daniela Ferreira, Carmen Martin Sierra, Paula Laranjeira, Catarina Simões pela amizade e boa disposição. Sem a vossa ajuda teria sido mais difícil. À Catarina Maia pelos sábios conselhos e pelas tutoriais. Às técnicas Isabel, Sandra, Susana e Anabela, que se mostraram sempre dispostas a ajudar.

À Doutora Margarida Coucelo pelo seu contributo na parte molecular do projecto, bem como à Ana Teresa e todas as pessoas envolvidas no Hospital Pediátrico.

À minha gerente, Rita Gomes, pela sua amizade e carinho ao longo destes dois anos, facilitando os meus horários para a realização deste estudo. Aos meus colegas "tiffosianos" pelo seu companheirismo, brincadeiras e disponibilidade para trocas, tendo sempre imensa paciência comigo.

À minha família, à minha irmã, ao Daniel, ao meu pai, aos meus avós e ao meu tio, pelo amor, carinho, atenção e alegria. Foram, são e serão sempre um apoio incondicional. À minha mãe, à pessoa que mais me apoia e que está sempre presente, para dar muito amor e força para seguir os meus sonhos.

À Joana, à Mafalda e à Rita pela amizade ao longo destes anos, pela vida académica, pelas chamadas e mensagens de carinho. À futura *designer*, Jéssica Marques pela sua amizade e sempre bom humor e, claro, pela linda imagem de capa desta tese.

Por último, e não menos importante, ao meu namorado Rui Francisco, pela compreensão, dedicação, paciência, e muito amor.

O meu profundo e sentido agradecimento a todas as pessoas que contribuíram directa ou indirectamente para a concretização desta tese.

*“If you can dream it, you can do it”*

*-Walt Disney*

## Índice

Resumo.....	15
Abstract .....	17
Introdução.....	19
1. A esquizofrenia e o seu impacto.....	20
1.1 Sintomas.....	20
1.1 Genética .....	21
1.2 Tratamentos .....	21
2. Fisiopatologia da Esquizofrenia .....	22
2.1 Alterações estruturais .....	22
2.2 Da hipótese dopaminérgica à transmissão glutamatérgica e gabaérgica .....	23
2.2.1 Relação dos receptores N-metil D-aspartato e a esquizofrenia .....	24
2.3 Neuroinflamação.....	27
2.3.1 O Stress oxidativo e as espécies reactivas .....	28
2.4 Inflamação periférica e a Esquizofrenia.....	28
3.1 Resposta Imune.....	32
3.2. Monócitos e Células Dendríticas.....	33
3.3 Alterações funcionais e fenotípicas de Monócitos e células dendríticas em doenças do SNC e autoimunes .....	36
4. Objectivos.....	39
5. Material e Métodos .....	41
5.1 Grupos de estudo .....	41
5.2 Ética.....	42
5.3 Recolha das amostras .....	42
5.4 Citometria de Fluxo .....	42
5.4.1 Quantificação das diferentes populações de monócitos e de células dendríticas.....	42
5.4.2 Quantificação da frequência de monócitos e células dendríticas produtoras de TNF- $\alpha$ e IL-6.....	43

5.4.3	Aquisição de dados por citometria de fluxo e análise.....	44
5.4.4	Cell Sorting.....	45
5.5	Avaliação da expressão génica de BDNF e CCL11 .....	46
5.5.1	Extracção de mRNA e Transcrição Reversa.....	46
5.5.2	PCR em tempo real .....	47
5.6	Análise Estatística .....	48
6.	Resultados .....	49
6.1	Avaliação da percentagem e valores absolutos das diferentes populações de monócitos e células dendríticas .....	49
6.2	Expressão de HLA-DR .....	51
6.3	Frequência de IgE ligada ao seu receptor de alta afinidade nos monócitos que expressam FcεRI, mCDs e pCDs.....	52
6.4	Quantificação da frequência de monócitos e células dendríticas produtoras de TNF-α ou IL-6 após activação <i>in vitro</i> .....	53
6.4.1	Avaliação da frequência de células produtoras de IL-6 e a quantidade de citocina produzida .....	54
6.4.2	Quantificação da frequência de células produtoras de TNF-α e a quantidade de citocina produzida.....	57
6.5	Expressão Génica de BDNF e CCL11 em monócitos e células dendríticas isolados por cell sorting .....	59
7.	Discussão.....	62
8.	Conclusão .....	70
9.	Bibliografia .....	72

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: densidade das espinhas dendríticas em controlo e em doentes com SCZ no PFC em modelos de ratos. (schizophrenia bull 36, 301-313 [2010]).....	22
Figura 2 Esquema da Via das Quinureninas. Alguns factores exteriores à via podem alterar o balanço dos metabolitos e a actividade das enzimas. (Schizophrenia research Elsevier, 07-018 [2014]) (41) .....	25
Figura 3 Esquema das alterações que ocorrem nas vias da quinureninas na activação do neurónio. O bloqueio do NMDAR pelo ácido KYN (Basic Neurochemistry, Chapter 39. Elsevier [2012]) (124).....	26
Figura 4 Teoria da interacção que ocorre entre a via das quinureninas e os receptores de NMDA dando origem à disfunção da via dopaminérgica característica da Esquizofrenia. (Schizophrenia research Elsevier, 07-018 [2014]) (41) .....	26
Figura 5 Vias de comunicação entre o sistema imune periférico e o SNC. (Psychopharmacology Review Springer, 1559-1573 [2015]) (125) .....	30
Figure 6. Relação entre a Inflamação patológica do SNC causada pela KYN produzida pelo macrófago, célula imune periférica.(Neuropsychopharmacology, 137-62 [2012]) (126).....	31
Figura 7 Nomenclatura dos monócitos no sangue. As três subpopulações apresentam diferentes símbolos, representando receptores próprios dessas populações. O gancho azul representa o CD14; A bandeira laranja o CD16. (Blood Journal, vol 116, number 6, 74-78 [2010])(84) .....	34
Figura 8 Ilustração da estratégia utilizada na definição das diferentes populações de monócitos e células dendríticas em humanos, baseada na expressão relativa de CD16 e CD14 em A e IgE e CD14. A azul temos as CDs; cor de rosa monócitos clássicos, laranja os monócitos não clássicos, a verde monócitos intermédios e a vermelho os monócitos com expressão de IgE. ....	35
Figura 9 Nomenclatura das células dendríticas no sangue. As três subpopulações apresentam diferentes símbolos, representando receptores próprios dessas populações. A verde o CD303; a azul o CD1c a vermelho o CD141. (BloodJournal, vol 116, number 6, 74-78 [2010])(84) .....	36
Figura 10 Estratégia para a identificação das diferentes subpopulações de monócitos e de células dendríticas mielóides. Os monócitos e as células dendríticas são selecionados a partir do gate do forward scatter (FSC), side scatter (SSC), CD33 e CD45 (a-c). No d temos o gate convencional que permite identificar as diferentes populações através da expressão de CD16 e CD14. Após a activação o CD16 perde-se, pelo que se usa a combinação de CD33 com CD14	



de modo a distinguir os monócitos clássicos e não-clássicos (f). A população de intermédios por sua vez é mais difícil de identificar aquando da estimulação. A vermelho temos os monócitos não clássicos; verde os monócitos clássicos; azul os monócitos intermédios; rosa os monócitos IgE; amarelo/castanho escuro as células dendríticas mielóides. ....45

Figura 11 Percentagem de monócitos clássicos (A); de monócitos intermédios, não clássicos e que expressam FcεR (B); de células dendríticas mielóides (C) e de células dendríticas plasmacitóides (D) do sangue periférico nos diferentes grupos de estudo. As diferenças estatisticamente significativas  $p < 0.05$  são representadas por um \* .....50

Figura 12 Valores absolutos (número de células por microlitro de sangue) de monócitos clássicos (A); monócitos intermédios, não clássicos e que expressam FcεR (B); células dendríticas mielóides (C) e células dendríticas plasmacitóides (D) nos diferentes grupos de estudo. As diferenças estatisticamente significativas  $p < 0.05$  são representadas por um \* ..51

Figura 13 Percentagem total das diferentes subpopulações de monócitos: clássicos (A), intermédios, não clássicos e IgE (B) nos diferentes grupos em estudo. Os resultados estão expressos em percentagem total de células (%) relativamente à percentagem de monócitos no sangue periférico. As diferenças estatisticamente significativas  $p < 0.05$  são representadas por um \* .....52

Figura 14 Média de Intensidade de Fluorescência (MIF) de HLA-DR pelas diferentes populações de monócitos, células dendríticas mielóides e células dendríticas plasmacitóides. Os resultados estão expressos em intensidade média de fluorescência. As diferenças estatisticamente significativas  $p < 0.05$  são representadas por um \* .....52

Figura 15 Média de Intensidade de Fluorescência (MIF) de HLA-DR pelas diferentes populações de monócitos, monócitos clássicos (A), monócitos intermédios (B), monócitos não clássicos (C), monócitos que expressam FcεRI (D) e células dendríticas mielóides (E), células dendríticas plasmacitóides (F) expressos em percentagem de células, nas amostras emparelhadas entre o grupo de doentes em surto e o grupo de doentes com psicose inicial. As diferenças estatisticamente significativas  $p < 0.05$  são representadas por um \* .....53

Figura 16 Média de Intensidade de Fluorescência (MIF) de IgE pelas diferentes populações de monócitos, células dendríticas mielóides e células dendríticas plasmacitóides. Os resultados estão expressos em intensidade média de fluorescência. As diferenças estatisticamente significativas  $p < 0.05$  são representadas por um \* .....54

Figura 17 Média de Intensidade de Fluorescência (MIF) de IgE nos monócitos que expressam FcεRI (A), células dendríticas mielóides (B) e células dendríticas plasmacitóides (C) expressos em percentagem de células, nas amostras emparelhadas entre o grupo de doentes em surto e

o grupo de doentes com psicose inicial. As diferenças estatisticamente significativas  $p < 0.05$  são representadas por um \*.....54

Figura 18 Frequência de produção de IL-6 pelas diferentes populações de monócitos, monócitos clássicos (A), monócitos intermédios (B), monócitos não clássicos (C), e células dendríticas mielóides (D), expressos em percentagem de células. As diferenças estatisticamente significativas  $p < 0.05$  são representadas por um \*.....55

Figura 19 Média de Intensidade de Fluorescência (MIF) de IL-6 pelas diferentes populações de monócitos e células dendríticas mielóides. Os resultados estão expressos em intensidade média de fluorescência. As diferenças estatisticamente significativas  $p < 0.05$  são representadas por um \*.....56

Figura 20 Frequência de produção de IL-6 pelas diferentes populações de monócitos, monócitos clássicos (A), monócitos intermédios (B), monócitos não clássicos (C), e células dendríticas mielóides (D), expressos em percentagem de células, nas amostras emparelhadas entre o grupo de doentes em surto e o grupo de doentes com psicose inicial. As diferenças estatisticamente significativas  $p < 0.05$  são representadas por um \*.....57

Figura 21 Média de Intensidade de Fluorescência (MIF) de IL-6 pelas diferentes populações de monócitos, monócitos clássicos (A), monócitos intermédios (B), monócitos não clássicos (C) e células dendríticas mielóides (D), expressos em percentagem de células, nas amostras emparelhadas entre o grupo de doentes em surto e o grupo de doentes com psicose inicial. As diferenças estatisticamente significativas  $p < 0.05$  são representadas por um \*.....57

Figura 22 Frequência de produção de TNF $\alpha$  pelas diferentes populações de monócitos e células dendríticas mielóides, expressos em percentagem de células. As diferenças estatisticamente significativas  $p < 0.05$  são representadas por um \*.....58

Figura 23 Média de Intensidade de Fluorescência (MIF) de TNF $\alpha$  pelas diferentes populações de monócitos e células dendríticas mielóides. Os resultados estão expressos em intensidade média de fluorescência. As diferenças estatisticamente significativas  $p < 0.05$  são representadas por um \*.....59

Figura 24 Média de Intensidade de Fluorescência (MIF) de TNF $\alpha$  pelas diferentes populações de monócitos, monócitos clássicos (A), monócitos intermédios (B), monócitos não clássicos (C), monócitos que expressam Fc $\epsilon$ RI (D) e células dendríticas mielóides (E), expressos em percentagem de células, nas amostras emparelhadas entre o grupo de doentes em surto e o grupo de doentes com psicose inicial. As diferenças estatisticamente significativas  $p < 0.05$  são representadas por um \*.....59

**Figura 25** Frequência de produção de TNF $\alpha$  pelas diferentes populações de monócitos, monócitos clássicos (A), monócitos intermédios (B), monócitos não clássicos (C), monócitos que expressam Fc $\epsilon$ RI (D) e células dendríticas mielóides (E), expressos em percentagem de células, nas amostras emparelhadas entre o grupo de doentes em surto e o grupo de doentes com psicose inicial. As diferenças estatisticamente significativas  $p < 0.05$  são representadas por um \* .....60

**Figura 26** Esquema que resume as principais conclusões do estudo realizado.....71

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 Características clínicas dos doentes no estudo e dos controlos .....	41
Tabela 2 Combinação de anticorpos utilizados na marcação do tubo 1 de citometria e respectiva informação de fluorescência, clone e volume .....	43
Tabela 3 Combinação de anticorpos utilizados na marcação dos tubos 2 e 3 de citometria e respectiva informação de fluorescência, clone e volume .....	44
Tabela 4 Anticorpos usados para o <i>cell sorting</i> e a respectiva informação de fluorescência, clone e volume .....	46
Tabela 5 Conjunto de primers (Forward e Reverse) e temperaturas de annealing utilizadas para a expressão dos genes GAPDH, BDNF e CCL11 .....	47
Tabela 6 Perfil da reação de qRT-PCR utilizado para a expressão dos genes em estudo .....	47
Tabela 7 Tabela de Expressão relativa do gene BDNF .....	60

## *ÍNDICE DE ABREVIATURAS*

**5HT** - Serotonina

**AMPA** -  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico

**APC**- Células Apresentadoras de Antígenos

**AR** - Artrite Reumatóide

**BBB** - Barreira Hematoencefálica

**BDNF** - Factor Neurotrófico Derivado do Cérebro

**CCL1** - Ligando da Quimiocina 1

**CDs** - Células Dendríticas

**CD** - Cluster of Differentiation

**CMH** - Complexo Major de Histocompatibilidade

**COX 2** - Ciclo-Oxigenase 2

**CVOs** - Órgãos Circunventriculares

**DAMPs** - Padrões Moleculares Associados a Perigo

**FSC** - Dispersão frontal da luz

**GAPDH** - Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

**GFAP** - Proteína Glial Ácida Fibrilar

**GWAS** - Estudos de Associação do Genoma

**IDO** - Enzima Indolamina 2,3 Dioxigenase

**IFN- $\gamma$**  - Interferão  $\gamma$

**IL-1 $\beta$**  - Interleucina 1 $\beta$

**IL-6** - Interleucina 6

**K2E K2EDTA** - Tubo de etilenodiaminotetracético dipotássio

**KYN** - Quirunenina

**KYNA** - Ácido Quinurénico

**LES** - Lúpus Eritematoso Sistémico

**LH** - Tubo de heparina-lítio

**LPS** - Lipopolysacchoride

**mCDs** - Células dendríticas mieloides

**MCP-1** - Proteína Quimioattractante Monocítica

**MIF** - Média de Intensidade de Fluorescência

**NAc** - Núcleo Accumbens

**NK** - Células Natural Killer

**NMDA** - Receptores de N-metil D-aspartato  
**NO** - Óxido Nítrico  
**NSAID** - Anti-Inflamatórios Não Esteróides  
**OS** - Stress Oxidativo  
**PAMPs** - Padrões Moleculares Associados a Patogénios  
**pCDs** – Células dendríticas mielóides  
**PFC** - Córtex Pré-frontal  
**PIC** - Ácido Picolínico  
**PPRs** - Receptores de Reconhecimento de Padrões  
**QUIN** - Ácido Quinólinico  
**RNS** - Espécies Reactivas de Nitrogénio  
**ROS** - Espécies Reactivas de Oxigénio  
**SNC** - Sistema Nervoso Central  
**SQZ** – Esquizofrenia  
**SSC** - Dispersão lateral da luz  
**Th** - Células T Auxiliares  
**TLRs** - Toll like receptors  
**TNF- $\alpha$**  - Factor de Necrose Tumoral- $\alpha$

*Resumo-Abstract*

## Resumo

Estudos nos últimos vinte anos verificam uma interacção complexa entre o sistema imune, inflamação sistémica e o cérebro, que conduzem a mudanças de humor, cognição e comportamento. A evidência de alterações nas células e na produção de citocinas inflamatórias ao nível do sistema imunitário periférico na esquizofrenia parece clara, no entanto, os mecanismos envolvidos na interacção entre o sistema nervoso central e a periferia mantêm-se por elucidar. A maioria dos estudos efectuados nesta doença incidem sobre os mecanismos patológicos ao nível do SNC, com activação das células imunitárias do cérebro. Contudo, o estado de neuroinflamação descrito poderá também activar sistemas inflamatórios periféricos, activando o sistema imunitário. Os monócitos e as células dendríticas são importantes constituintes da imunidade inata, desempenhando funções cruciais na activação do sistema imunitário. Estas células apresentadoras de antígenos são versáteis, regulando o processo inflamatório e induzindo imunidade.

O principal objectivo desta tese foi quantificar e analisar fenotípica e funcionalmente as diferentes subpopulações de monócitos (clássicos, intermédios, não clássicos e que expressam o FcεRI) e as populações de células dendríticas (mielóides e plasmacitóides), num grupo controlo, num grupo de doentes após um episódio de surto psicótico, e em doentes numa fase inicial da doença (Psicose Aguda e Transitória) fora de um episódio de surto, de modo a verificar se essas populações se encontram alteradas, podendo desta forma constituírem um bom alvo de estudo para a monitorização da evolução da doença.

Para o estudo foram recrutados, com médias de idades semelhantes entre os grupos de estudo ( $\pm 3$  anos), 10 controlos, 17 doentes em fase de surto e 6 doentes em psicose inicial sob influência de tratamento com antipsicóticos, diagnosticados utilizando o critério ICD-10 da Organização Mundial de Saúde. A análise das diferentes subpopulações de monócitos e de células dendríticas foi efectuada através de citometria de fluxo, e após activação *in vitro* com LPS e IFN- $\gamma$  quantificou-se a frequência de células produtoras de citocinas (IL-6 e TNF- $\alpha$ ), bem como, a produção destas citocinas por célula. Para a análise da expressão génica de BDNF e CCL11 após o *cell sorting* de todas as células que expressavam fortemente CD33, que engloba todas as subpopulações de monócitos e as células dendríticas mielóides, bem como após extracção de RNA e transcrição reversa, foi efectuada uma reacção em cadeia da polimerase em tempo real.

Observou-se, no grupo de surto psicótico, um aumento da frequência de monócitos não clássicos produtores de IL-6, bem como, um aumento da quantidade desta citocina intracelular, em todas as subpopulações de monócitos e células dendríticas mielóides, indicando que estas



células poderão ser responsáveis pelo estado de inflamação aguda que parece verificar-se nesta fase da doença. Em oposição à IL-6, a frequência de monócitos não clássicos produtores de TNF- $\alpha$ , e a quantidade de citocina por célula, está aumentada em doentes que se encontram fora de surto, que em associação ao aumento de expressão de HLA-DR, sugere um perfil de activação destas células diferente dos doentes em surto. A descoberta de um aumento da expressão da IgE ligado ao seu receptor de alta afinidade traduz um aumento da IgE sérica nestes doentes, associado ao fenótipo de activação observado nas células dendríticas mielóides nos doentes em surto.

Estes resultados demonstram que ocorrem alterações fenotípicas e funcionais nos monócitos e células dendríticas na doença, salientando-se claramente os monócitos não clássicos, sugerindo que deve ser aprofundado o seu estudo na doença de forma a poderem constituir-se bons marcadores biológicos na esquizofrenia.

## Abstract

Studies in the last two decades identified a complex interaction between immune system, systemic inflammation and the brain, leading to humour, cognition and behaviour dysfunctions. While evidence of alterations in immune cells and production of cytokines in peripheral immune system in schizophrenia becomes clear, the mechanisms involved in central nervous system and periphery needs to be elucidate. The majority of studies in this disease rely on pathological mechanisms in the CNS, with activation of brain immune cells. However, this state of neuroinflammation could lead to activation of peripheral inflammatory systems activating immune system. Monocytes and dendritic cells are very important cells in innate immunity, having crucial function in activation of immune system. These antigen presenting cells are versatile and regulate the inflammatory process and induce immunity.

The aim of this study was the quantification and analysis, phenotypical and functionally, different subpopulations of monocytes (classical, intermediate, non-classical, and high expressed FcεRI receptor) and dendritic cells (myeloid and plasmacytoid) in a healthy group, a first episode psychosis group, and early stage group, to understand if these populations are altered in schizophrenia, becoming a potential target of monitorization of the course of this psychiatric disease.

Three aged-matched subject groups ( $\pm 3$  years) were recruited: 10 healthy controls, 17 patients in a psychotic episode and 6 patients in an early stage SCZ under antipsychotic treatment diagnosed by ICD 10 criteria from World Health Organization. The analysis of the different subpopulations of monocytes and dendritic cells were performed by flow cytometry, and after in vitro activation with LPS and IFN- $\gamma$ , the frequency of cells that produced cytokines were evaluated, as well as the production of cytokine per cell. For BDNF and CCL11 gene expression analysis a cell sorting was performed by sorting cells expressing high levels of CD33, monocytes and dendritic cells, and after RNA extraction and reverse transcription, was performed a real time polymerase chain reaction.

In psychotic episode, our results showed an increased frequency of non classical monocytes production of IL-6, as well as an increased production of this intracellular cytokine per cell in all monocytes subsets and myeloid dendritic cells suggesting that these cells may be responsible for the acute state of inflammation present in this fase of the disease. In contrast to IL-6, we observed in early stage patients an increased of cell production TNF- $\alpha$  frequency which in association with an increased of HLA-DR expression, suggests an inflammatory profile of these cells in this grupo of patients. The finding in the increased expression of IgE binding his high

affinity receptor indicates an increased serum IgE in SCZ patients, associated to the observed activation phenotype in myeloid dendritic cells in a psychotic episode patients.

Taken together, our findings demonstrate phenotypical and functional alterations in monocytes in SCZ, namely non classical monocytes, suggesting the need to study these findings for a greater knowledge of these cells as potential target for monitorization of biomarkers in SCZ.

## *Introdução*

## 1. A esquizofrenia e o seu impacto

A Esquizofrenia caracteriza-se como uma doença psiquiátrica que afecta cerca de 1% da população mundial (1,2). A característica mais evidente de um esquizofrénico passa pela incapacidade de distinguir a realidade da sua imaginação. Os doentes apresentam uma grave desestruturação psíquica, perdendo a capacidade de integrar as emoções, os sentimentos e os pensamentos, conduzindo a delírios e alucinações. Segundo a Organização Mundial de Saúde, dentro das várias doenças mentais, a esquizofrenia é a terceira principal causa de perda de qualidade de vida entre os 15 e os 44 anos. Apesar de a doença não ter cura, com um tratamento adequado a pessoa pode recuperar e voltar a viver a sua vida normalmente. A SCZ, na maioria dos casos, tem início na fase da adolescência e de jovem adulto, sendo que nos homens é mais precoce, entre os 15 e os 25 anos, nas mulheres, entre os 25 e 35 anos. Esta discrepância acredita-se ter origem na implicação de factores hormonais e na diferença dos estados de desenvolvimento cerebral (3). Cerca de 50% dos doentes com esquizofrenia tentam o suicídio, e dentro desses, 15% são bem sucedidos (4). O impacto da doença não se centra apenas na vida do doente, afectando também a sua relação com o mundo, família e amigos, sendo capaz de destruir as relações pessoais devido a severidade de alguns sintomas. Várias descobertas actuais permitem uma identificação precoce da doença e um tratamento mais rápido e eficaz, que tem como objectivo a estabilização do doente, melhorando a sua qualidade de vida. Contudo, o conhecimento insuficiente dos mecanismos moleculares que lhe dão origem e o modo da sua progressão mantêm-se um desafio.

### 1.1 Sintomas

A doença apresenta um vasto espectro de sintomas que variam consoante o estado da doença (5). Os sintomas positivos estão directamente relacionados com o surto psicótico: estado mental agudo, com elevada desorganização psíquica. Estes caracterizam-se por alucinações (visuais, auditivas e tácteis) e fenómenos delirantes que levam à perda do sentido da realidade. Os sintomas positivos podem não ocorrer em todos os casos de SCZ e, mesmo presentes, a sua intensidade pode variar, bem como a qualidade. Há doentes que não têm alucinações, havendo outros com uma maior desorganização psíquica e comportamentos delirantes. Os sintomas negativos, por sua vez, estão relacionados com a fase crónica da doença, estendem-se por mais tempo e estão presentes a longo prazo. A falta de vontade e iniciativa

própria, desinteresse e indiferença nas actividades do quotidiano ou pelas que anteriormente davam prazer, com preferência pelas actividades mais passivas, são alguns dos sintomas desta categoria. Muitos doentes também têm dificuldade em expressar sentimentos, o que não quer dizer que não os sintam. Algumas funções mentais podem estar implicadas, como o pensamento, as ideias e a fala, estando desconectados e lentos. Por último, o défice cognitivo, onde os doentes revelam reduzida capacidade de escrita, aprendizagem, leitura e memória. De certo modo, a cognição encontra-se comprometida, revelando falta de atenção e capacidade de concentração, sendo facilmente distraídos de qualquer actividade.

Como a SCZ é um transtorno com uma apresentação muito heterogénea, com quadros clínicos muito distintos, existem doentes com maior ou menor grau de comportamento que variam consoante a fase da doença.

### 1.1 Genética

A SCZ é de causa multifactorial, envolvendo tanto factores genéticos como ambientais. Existem genes descritos na literatura que poderão estar relacionados com a doença, envolvidos em funções importantes que regulam várias etapas do neurodesenvolvimento, assim como a produção de neurotransmissores. Em teoria, esses genes são activados devido a factores ambientais de risco, desencadeando uma cascata de eventos que conduzem ao condicionamento do neurodesenvolvimento das redes de neurónios. Estudos de associação de genoma (GWAS) indicam também a prevalência de genes imunes como principais nos factores de risco da doença. De facto, Shi et al 2009 demonstram que existe relação entre os genes envolvidos na regulação do sistema imunitário e o aumento do risco de SCZ (6).

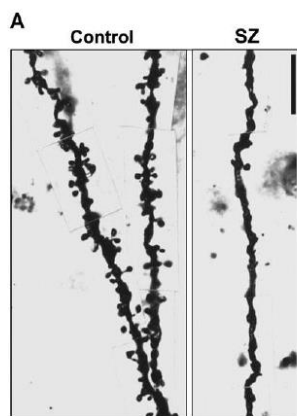
### 1.2 Tratamentos

A medicação da esquizofrenia baseia-se no controlo dos sintomas mais exacerbantes, como os positivos, que envolvem os anti-depressivos e os antipsicóticos. Estes medicamentos originam um efeito calmante, actuando sobre os receptores de neurotransmissores, diminuindo os sintomas. A Clorpromazina e o haloperidol são os antipsicóticos de primeira geração mais utilizados, já que apresentam maior afinidade para os receptores de dopamina. No entanto, em alguns doentes, verificou-se a existência de efeitos secundários, como o parkinsonismo, levando à utilização de antipsicóticos de segunda geração, que actuam não apenas no bloqueio dos receptores de dopamina mas também da serotonina (5HT), tais como, a clozapina e a olanzapina

## 2. Fisiopatologia da Esquizofrenia

### 2.1 Alterações estruturais

Diversos estudos feitos até ao momento verificaram alterações estruturais nas espinhas das dendrites de neurónios do córtex pré-frontal (PFC), hipocampo e amígdala (7), nomeadamente ao nível da sua densidade, onde se encontram ancorados receptores de neurotransmissores, peptídeos, microtúbulos de actina, entre outros, que têm, no seu conjunto, a função de regular a passagem do impulso nervoso, geralmente, excitatório. As dendrites dos neurónios encontram-se em constante desenvolvimento durante a infância e a adolescência, estabilizando apenas quando é atingida a idade adulta. No entanto, esta estabilização não é um processo estático, ocorrendo uma constante renovação da actina e dos microtúbulos (8), de modo a que a integridade da densidade das espinhas seja mantida. Sendo um dos principais locais onde ocorrem os “*inputs*” excitatórios para o neurónio, ao haver alterações na sua estrutura ocorrem perdas ou ganhos na neurotransmissão destes impulsos excitatórios, resultando na desregulação da estabilidade neuronal (9).



**Figura 1 Densidade das espinhas dendríticas em controlo e em doentes com SCZ no PFC em modelos de ratos. (schizophrenia bull 36, 301-313 [2010])**

Alguns estudos demonstraram a presença de cérebros mais pequenos nos doentes com esquizofrenia, explicando esse facto pela diminuição do volume de massa cinzenta, sendo mais acentuado em doentes com idade mais avançada. De certa forma, a perda de massa cinzenta em doentes mais velhos sugere uma perda progressiva do volume cerebral de massa cinzenta com o avanço da doença, revelando a existência de um processo degenerativo (10).

Outros estudos indicam que tanto o factor neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), importante para o crescimento e sobrevivência dos neurónios em desenvolvimento, como o óxido nítrico (NO), factor importante para o desenvolvimento de sinapses excitatórias, ao promoverem o crescimento das espinhas dendríticas, encontram-se diminuídos na esquizofrenia (11,12).

Estes resultados sugerem que alterações na estrutura das dendrites, perda de massa cinzenta, diminuição da expressão de BDNF e NO, são factores evidentes em doentes com esquizofrenia que poderão constituir uma das causas para o aparecimento da doença ou uma consequência que conduz à sua progressão.

## 2.2 Da hipótese dopaminérgica à transmissão glutamatérgica e gabaérgica

Apesar dos mecanismos da doença se encontrarem por elucidar, têm sido colocadas algumas teorias a fim de explicar os resultados de alguns estudos. A hipótese do envolvimento da via dopaminérgica surge quando comparados os sintomas da esquizofrenia aos sintomas observados após a administração de anfetamina. Esta molécula, sendo um agonista indirecto dos receptores de dopamina, produz comportamentos semelhantes à doença, e quando administrada em doentes, esses sintomas são exacerbados (13). Contudo, os tratamentos que modulam a via dopaminérgica não conseguem controlar todos os sintomas da doença, o que sugere que outras alterações estão envolvidas ao nível do sistema nervoso central (SNC).

Uma das vias de transmissão dopaminérgica ocorre para o PFC, activando-o, e deste ocorrem projecções glutamatérgicas para as diversas zonas do cérebro que controlam as emoções, movimentos e pensamentos. Além da dopamina, o PFC recebe também projecções glutamatérgicas da amígdala e do hipocampo, e destas três zonas são enviadas projecções para o núcleo accumbens (NAc). Por sua vez, no NAc, o glutamato activa a transmissão gabaérgica, resultando na inibição da actividade neuronal do pallidum ventral, promovendo a activação no tálamo dorsomedial (14). A activação deste circuito resulta na activação do PFC, indicando que a esquizofrenia não se deve apenas a uma hiperactividade da dopamina no mesmo, mas sim dos contributos da actividade glutamatérgica e gabaérgica no seu conjunto, que têm como consequência um desequilíbrio entre a transmissão excitatória e a inibitória.

O PFC, ao regular a atenção, a emoção, a motivação, o controlo e a cognição, leva a querer que a doença se centraliza em alterações na função do mesmo, conduzindo aos sintomas da doença (15). De facto, o PFC constitui uma das zonas do cérebro onde ocorre plasticidade sináptica, já que as experiências, lesões, estimulantes e aprendizagem culminam numa alteração da expressão de receptores de N-metil D-aspartato (NMDA) e de  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-

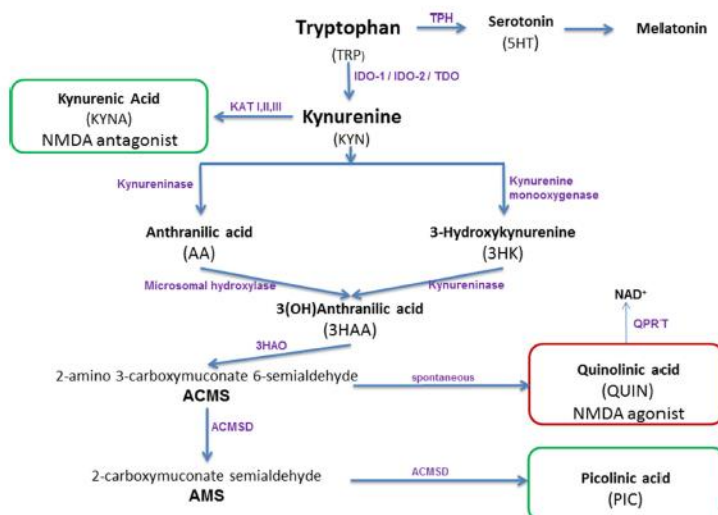


isoxazolepropiónico (AMPA) ao nível do mesmo. Estas alterações não ocorrem apenas ao nível do terminal nervoso, nem das espinhas dendríticas, mas também ao nível das conexões e rearranjos dos neurónios (16).

### 2.2.1 Relação dos receptores N-metil D-aspartato e a esquizofrenia

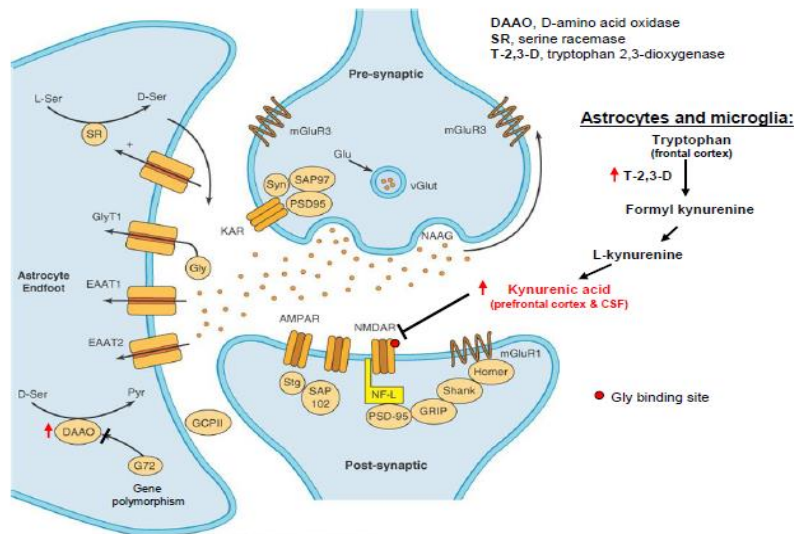
Originalmente pensava-se que as deficiências na via dopaminérgica, nomeadamente a sua hiperactividade, poderia estar na origem da SQZ. No entanto, a sua desregulação não é comum a todos os doentes esquizofrénicos, corroborando a teoria da influência das vias glutamatérgicas e gabaérgicas no circuito. A sinalização glutamatérgica e dopaminérgica está intrinsecamente ligada, onde a dopamina activa as vias glutamatérgicas, e, conseqüentemente, os receptores NMDA, que por sua vez podem aumentar ou inibir a actividade dopaminérgica (17). O antagonismo de receptores de NMDA resulta na hipofunção da transmissão glutamatérgica, o que diminui a activação da via gabaérgica, levando a um desequilíbrio na inibição da transmissão. Por sua vez, teremos uma hiperactividade da via dopaminérgica que poderá estar envolvida, e ser a causa, dos sintomas psicóticos e do défice cognitivo em SCZ. Pomarol-Clotet et al 2006 referem que o uso de Ketamina como bloqueante dos receptores NMDA em controlos tem como resultado o aparecimento de sintomas psicóticos, tais como a paranóia e a desorganização do pensamento (18). A envolvência dos receptores de NMDA está associada a diversos casos de psicoses, podendo também relacionar-se com a fisiopatologia da SQZ. Autoanticorpos contra receptores NMDA foram reportados em casos de psicoses (19–21), e segundo Zandi et al 2014 ao eliminar estes autoanticorpos por imunoterapia os sintomas psicóticos são melhorados em alguns casos de ocorrência do primeiro surto psicótico (22).

Para compreender melhor o papel dos receptores de NMDA na doença, teremos que olhar para a Via das Quinureninas, e de que modo estas antagonizam estes receptores, dando origem aos sintomas da doença. O triptofano é um aminoácido essencial que serve de precursor para a produção da serotonina, um importante neurotransmissor que se acreditava ter uma grande influência na doença, até ser descoberta a importância da via dopaminérgica. Contudo, não se coloca de parte a importância da serotonina na doença, já que tratamentos recorrendo a bloqueadores dos receptores desta molécula, em conjunto com antagonistas dos receptores dopaminérgicos, têm melhores efeitos no controlo dos sintomas positivos da doença (23).



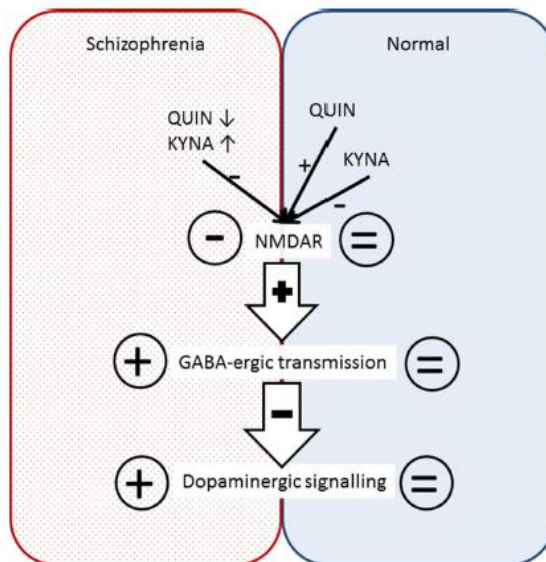
**Figura 2** Esquema da Via das Quinureninas. Alguns factores exteriores à via podem alterar o balanço dos metabolitos e a actividade das enzimas. (Schizophrenia Research Elsevier, 07-018 [2014]) (41)

Perante uma inflamação a via das quinureninas fica activada (24). O triptofano é convertido em quinurenina (KYN), e esta pode dar origem ao ácido quinurénico (KYNA) ou, seguir outra via, convertendo-se em ácido quinolínico (QUIN) ou ácido picolínico (PIC). Enquanto o PIC possui propriedades neuroprotectoras (25), o QUIN é produzido por monócitos activados (26). Já o KYNA é sintetizado por astrócitos no SNC (27). Tanto o KYNA como o QUIN, produzidos pelos astrócitos e monócitos, respectivamente, aumentam em caso de inflamação, tendo particular relevância na esquizofrenia devido à sua capacidade de modular os receptores NMDA. A interleucina-6 (IL-6), bem como outras citocinas pró-inflamatórias activam a enzima indolamina 2,3 dioxigenase (IDO), que por sua vez faz a conversão do triptofano em KYN, conduzindo ao aumento KYNA, antagonista natural dos receptores de NMDA (28), e aumento do QUI, agonista dos receptores NMDA e neurotóxico.



**Figura 3** Esquema das alterações que ocorrem nas vias da quinureninas na activação do neurónio. O bloqueio do NMDAR pelo ácido KYNA (Basic Neurochemistry, Chapter 39. Elsevier [2012]) (124)

Acredita-se que os receptores de NMDA possam estar intrinsecamente envolvidos nas vias afectadas pela doença, relacionando também a activação das células da glia do SNC e a activação da via das quinureninas. A figura 4 mostra como essa relação pode influenciar a hiperactividade da via dopaminérgica, envolvendo as vias glutamatérgicas e gabaérgicas.



**Figura 4** Teoria da interacção que ocorre entre a via das quinureninas e os receptores de NMDA dando origem à disfunção da via dopaminérgica característica da Esquizofrenia. (Schizophrenia research Elsevier, 07-018 [2014]) (41)

### 2.3 Neuroinflamação

Existem algumas dificuldades em distinguir eventos primários e secundários na doença, de forma a que seja elaborada uma cascata de acontecimentos. Nesta luta de pensamento pode afirmar-se com toda a certeza que a inflamação se encontra associada a mecanismos patológicos na via da dopamina, no entanto, não se sabe se serão a causa ou consequência secundária de um percurso de neurogeneração. Existem evidências claras da activação de vias inflamatórias importantes, uma vez que estudos *post-mortem* efectuados em cérebros de doentes esquizofrénicos revelam a existência de neuroinflamação (29), ocorrendo maioritariamente pela activação da microglia, com consequente libertação de citocinas pró-inflamatórias. Fármacos dopaminérgicos são eficientes no controlo da alucinação e outros sintomas positivos, no entanto revelam-se ineficazes no controlo dos negativos e do défice cognitivo. Contudo, a Minociclina, agente anti-inflamatório tetracíclico, melhora os sintomas negativos e funções cognitivas em SCZ (30).

O cérebro possui o seu próprio sistema imune, constituído por células da glia que se assemelham aos macrófagos no sistema imunitário periférico, sendo que os astrócitos também desempenham funções importantes, quer pró, quer anti-inflamatórias. Em caso de lesão neuronal ocorre libertação de proteínas pró-inflamatórias, como o factor de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e o interferão  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), e a microglia torna-se reactiva, libertando citocinas inflamatórias (31), tais como a interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), a interleucina 6 (IL-6), o IFN- $\gamma$ , o ligando da quimiocina 1 (CCL1) e a ciclo-oxigenase 2 (COX 2). Estudos *post-mortem* mostram alterações na estrutura das células da glia (32), com um aumento considerável do número de microglia reactivas quando comparado com controlos (1,33). A libertação de IL-1 $\beta$  pela activação da microglia induz a activação de astrócitos que por sua vez produzem igualmente citocinas inflamatórias, tais como, o TNF- $\alpha$  e a IL-1 $\beta$  (34), bem como a proteína glial ácida fibrilar (GFAP) (35). A presença destas proteínas inflamatórias noutras células da glia, bem como a activação de cascatas de sinalização e das caspases, levam à ocorrência de lesão neuronal, conduzindo, por sua vez, à desregulação dos sistemas dopaminérgico e glutamatérgico. De igual modo, o aumento da função dos astrócitos aumenta a recaptação de glutamato, alterando a via metabólica que dá origem à glutamina.

A activação das células imunitárias do SNC devido à doença poderá também activar sistemas inflamatórios periféricos no doente, activando o sistema imunitário. Alguns estudos mostram um aumento de IL-6 no plasma sanguíneo (36,37), bem como de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ . Contudo esta relação entre a esquizofrenia e a inflamação periférica não se encontra totalmente

elucidada. Para melhor se compreender este efeito da inflamação, foi administrada uma terapia combinada com anti-inflamatórios não esteróides (NSAID), verificando-se uma diminuição acentuada dos sintomas da doença (38–40) em alguns casos, mas nenhuma alteração em outros.

### 2.3.1 O Stress oxidativo e as espécies reactivas

O sistema inato produz espécies reactivas de oxigénio (ROS) e de nitrogénio (RNS), contribuindo para a morte dos agentes patogénicos fagocitados. A activação de microglia, na presença de IL-6 e TNF- $\alpha$ , conduz à activação da produção de ROS que induzem mecanismos de apoptose celular.

Uma outra via que promove o *stress* oxidativo (OS) na SCZ ocorre no metabolismo do glutamato ao activar os receptores de NMDA. Em circunstâncias não patológicas, o glutamato é recaptado pelos astrócitos e convertido em glutamina. No entanto, um maior número de astrócitos activados conduz ao aumento do *uptake* de glutamato e a sua conversão em glutamina no sistema nervoso, aumentando o fluxo de cálcio que entra nos neurónios que promove a excitação e, conseqüentemente, a neurotransmissão. Estes mecanismos contribuem para uma desregulação e disfunção da sinapse, verificando a excitotoxicidade nos neurónios, que caracteriza a esquizofrenia e os surtos psicóticos (41)

Denes *et al* defendem que existe uma sequência de processos inflamatórios no SNC que estão presentes não só na esquizofrenia, mas em todas as doenças neurológicas que envolvem a neurodegeneração. Em primeiro lugar, temos a produção de citocinas pró-inflamatórias, com conseqüente activação da glia, libertando por sua vez citocinas inflamatórias que activam caspases e promovem a produção de espécies reactivas. Este processo inflamatório contínuo, sem resolução, promove falhas na integridade da barreira hematoencefálica (BBB), aumentando a sua permeabilidade. Ocorre a infiltração de células imunes periféricas, conduzindo posteriormente à morte celular dos neurónios (42).

## 2.4 Inflamação periférica e a Esquizofrenia

A possível associação entre a SCZ e o sistema imunitário foi proposta há mais de um século atrás, e é suportado por diversos estudos epidemiológicos e genéticos que apontam para a ligação entre a infecção e a inflamação, sugerindo a hipótese do envolvimento de processos inflamatórios como pontos-chaves para a fisiopatologia (43). Contrariamente à tradicional forma de encarar o SNC como um órgão imunopreviligiado, protegido pelo sistema periférico,

estudos nos últimos vinte anos notaram uma interacção complexa entre o sistema imune, a inflamação sistémica e o cérebro, que conduzem a alterações de humor, cognição e comportamento.

Como vimos até agora é evidente a existência de neuroinflamação, com uma elevada activação da microglia, produção de citocinas pró-inflamatórias e alterações nas vias da quinureninas que, conseqüentemente alteram a neurotransmissão das vias glutamatérgicas e dopaminérgicas. Contudo, existe uma rede de comunicação entre várias células do SNC, a barreira hematoencefálica e a periferia (44). Esta comunicação é efectuada através de uma família de mediadores que são finamente regulados: catecolaminas, quimiocinas, citocinas, prostaglandinas e factores tróficos, que têm como funções reconhecer, inibir e amplificar diferentes sinais em todas as direcções.

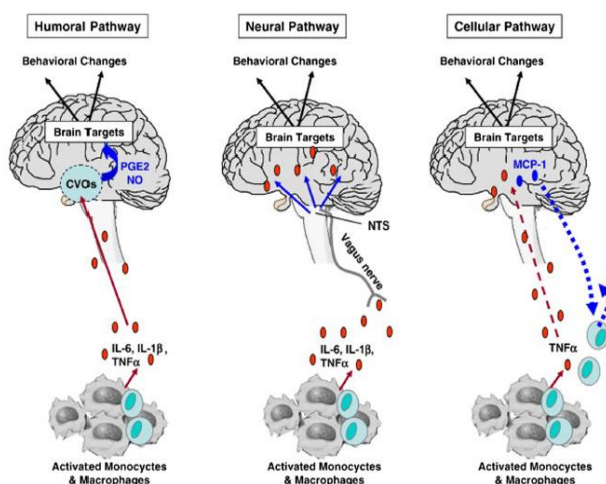
Em casos de inflamação ocorrem processos neurodegenerativos, conduzindo a uma desregulação das funções cerebrais importantes tais como o equilíbrio da transmissão inibitória e excitatória, *stress*, plasticidade sináptica e apoptose (45). Estes processos poderão estar na origem de diversas doenças psiquiátricas, nomeadamente a SQZ. Hanson and Guttesman em 2005 verificaram que existe um aumento da permeabilidade da BBB em doentes de SQZ, dando origem à entrada de mediadores inflamatórios da periferia e à sua saída (46). Torna-se evidente a existência de uma relação entre os processos inflamatórios que ocorrem no cérebro e a sua influência sobre o sistema imune periférico, e vice-versa. Ao determinar alterações periféricas, nomeadamente moleculares relacionadas com a inflamação em pessoas com alterações psicóticas poderão ser úteis para monitorização do percurso normal da doença, revelando de forma mais clara os seus processos fisiopatológicos.

Vários estudos são levados a cabo de modo a compreender melhor a relação existente entre o SNC e o sistema periférico em patologias que ainda não se compreendem claramente. Na SCZ, ocorre o aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias no sangue (37), o aumento da expressão de genes inflamatórios em monócitos (47,48), bem como, alterações nas funções de alguns linfócitos T (49). As citocinas plasmáticas na SCZ tem sido associadas a determinados sintomas clínicos, tais como o défice cognitivo, a perda de volume cerebral (50,51) e sintomas negativos (52–54). Harris et al 2012, comparou as mesmas citocinas que se encontravam no plasma e no tecido nervoso *post mortem*, quer em controlos, quer em SCZ, encontrando as mesmas alterações, mostrando a possibilidade de existirem biomarcadores periféricos (55).

Durante a adolescência e na fase jovem adulto, o neurodesenvolvimento passa por diversos processos de maturação, tais como a mielinização das fibras dos axónios, bem como de outras estruturas centrais dos diferentes neurónios das várias vias. Desta forma, uma activação prematura do sistema imune causa a activação da microglia conduzindo a processos

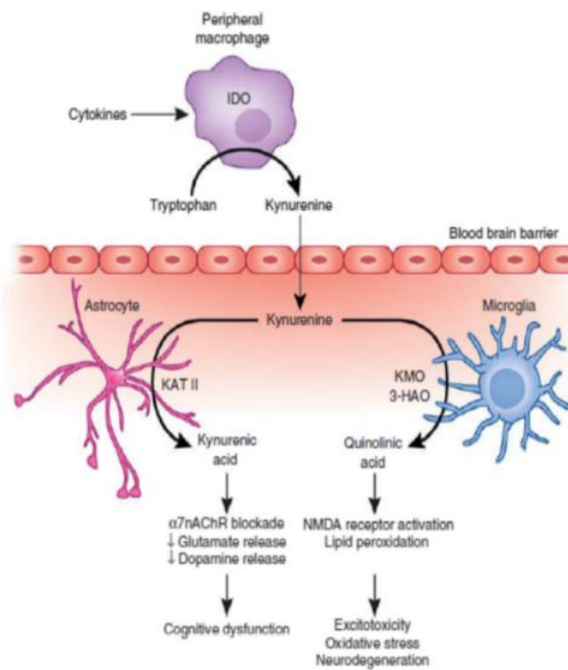
inflamatórios no SNC (56,57). Dados epidemiológicos revelam a existência de uma relação entre uma infecção, “falhas” ou “ativação” do sistema imune, e a SQZ. Noll, em 2004, verificou que uma mesma infecção ocorrida num grupo em estudo, originou em todos alterações de humor e, em determinados casos, disfunção cognitiva, tal como na SQZ (58). Menninger, em 1926, descreveu 200 casos de psicose após uma epidemia por uma infecção viral (59). A esquizofrenia é constantemente associada a um aumento da prevalência de várias infecções que incluem o vírus herpes (60,61) e parasitas intracelulares (62), e mesmo crianças com doenças atópicas tais como asma, equizemas, entre outras, apresentam sintomas psicóticos na adolescência (63).

Tendo em conta os resultados até agora disponíveis verifica-se que a SCZ poderá estar associada a alterações nas componentes de comunicação entre o cérebro e o sistema imune periférico. As citocinas periféricas têm a capacidade de comunicar com o cérebro através de três vias: neuronal, hormonal e celular, que activam a microglia. Na via neuronal, as células do sistema imunitário inato reconhecem as PAMPs e libertam citocinas que activam os nervos vagos aferentes. O estímulo chega às projecções primárias e secundárias atingido o *nucleus tractus solitarius* e subsequentemente o núcleo hipotalâmico (64). Na via humoral, além das citocinas libertadas pelos monócitos, os órgãos circumventriculares (CVOs) dão acesso directo aos PAMPs, que induzem produção local de citocinas pró-inflamatórias pelas células da glia. Desta forma, teremos uma maior quantidade de citocinas a atingir o cérebro que na via neuronal (65). A via celular conduz à produção da proteína quimioattractante monocítica (MCP-1) pela célula da glia activada pelo TNF- $\alpha$ , responsável por atrair monócitos ao cérebro (66). Os monócitos uma vez no cérebro conduzem à libertação de proteínas pró inflamatórias, citocinas, quimiocinas e proteases.



**Figura 5 Vias de comunicação entre o sistema imune periférico e o SNC. (Psychopharmacology Review Springer, 1559-1573 [2015]) (125)**

Na figura 6 vemos um exemplo da interação do sistema periférico com o SNC através de um macrófago, contribuindo dessa forma para a fisiopatologia da doença. A activação da enzima IDO por citocinas pro-inflamatórias (ex: IL-6) produzidas por células imunitárias periféricas (por exemplo macrófagos ou células dendríticas) conduzem à produção de quinurenina, que se converte em ácido quinurénico pelos astrócitos ou em ácido quinólico na microglia. Como vimos anteriormente, ambos têm efeitos negativos no SNC, promovendo a sua disfunção, *stress* oxidativo e, conseqüentemente, a sua neurodegeneração.



**Figure 6. Relação entre a Inflamação patológica do SNC causada pela KYN produzida pelo macrófago, célula imune periférica. (Neuropsychopharmacology, 137-62 [2012]) (126)**



### 3 Sistema Imunitário

#### 3.1 Resposta Imune

A inflamação é um mecanismo biológico bastante complexo, sendo considerado um evento da imunidade inata com a finalidade de proteger o nosso organismo. Contudo, se o processo se tornar demasiado intenso (hiperactividade dos mediadores) ou se se prolongar (resolução ineficiente), torna-se prejudicial.

O sistema imune é dividido em inato e adaptativo. A imunidade inata não possui especificidade na resposta imune, ocorrendo essencialmente a digestão de microrganismos e substâncias estranhas ao organismo. As principais células envolvidas nesta resposta são os monócitos/macrófagos, as células dendríticas, as células Natural Killer (NK) e os neutrófilos. Por outro lado, a imunidade adquirida é específica para um dado antígeno, envolvendo a formação de memória por parte das células que actuam neste tipo de resposta, os linfócitos B e T.

No início de uma resposta imune por ocorrência de uma lesão no tecido ou infecção, os receptores PRRs (do inglês *pattern recognition receptor*; receptor de reconhecimento de padrões), das células da imunidade inata, tais como os “Toll like receptors” (TLRs), reconhecem pequenas moléculas, padrões moleculares, quer associados a patógenos, os PAMPs, quer associados a perigo (*danger associated molecular patterns*: DAMPs) (67). Após o reconhecimento destes sinais, as células libertam mediadores inflamatórios que recrutam leucócitos ao local da ocorrência da lesão, activando o sistema do complemento, dando início ao processo de inflamação aguda. Através do recrutamento de monócitos, que se diferenciam em macrófagos ao chegarem ao local da lesão, e de outros granulócitos polimorfonucleares, ocorre desgranulação e libertação de factores inflamatórios, assim como citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas pelas células imunes locais. Este processo conduz ao recrutamento de mais células ao local da inflamação.

A ligação entre a imunidade inata e adquirida é efectuada pelas células dendríticas, as quais captam o antígeno e o levam até aos órgãos linfóides secundários onde podem desencadear respostas antígeno-específicas. A migração e maturação destas células é dependente de moléculas como as de Complexo Major de Histocompatibilidade (MHC) de classe I e II, de moléculas co-estimuladoras (CD40, CD80 e CD86) e da produção de citocinas. Todas estas moléculas permitem uma óptima interacção entre as células dendríticas (CDs) e as células T auxiliares (Th) naive e T citotóxicas. Paralelamente à ocorrência e activação destes processos pró-inflamatórios, ocorre também a libertação de mediadores anti-inflamatórios. O balanço entre os processos anti e pró inflamatórios são cruciais para equilibrar a inflamação local aguda.

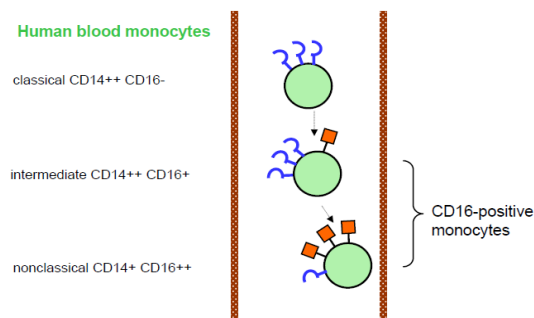
Após a apresentação de antígenos, os mediadores anti-inflamatórios aumentam, promovendo a libertação de outros mediadores que sinalizam a reparação e cicatrização dos tecidos (68).

Contrariamente às células do sistema inato, os linfócitos reconhecem padrões específicos. Deste modo, ao ocorrer o recrutamento de mais linfócitos B e T aumentam a sua especificidade para reconhecer antígenos específicos da lesão ocorrida. Este processo pode ocorrer durante vários dias durante os quais a inflamação persiste. A ocorrência de inflamação durante mais de 6 semanas é designada de inflamação crónica, processo biológico em que os mecanismos de inflamação e reparação ocorrem em paralelo sem nenhum destes cessar (69). Na inflamação crónica não ocorre resolução da inflamação devido a uma falha no sistema anti-inflamatório endógeno, permanecendo os mecanismos pró-inflamatórios e as células do sistema imune constantemente activados (70).

### 3.2. Monócitos e Células Dendríticas

Os monócitos e as células dendríticas são importantes constituintes da imunidade inata, desempenhando funções cruciais na activação do sistema imunitário. Estas células apresentadoras de antígeno, versáteis que, ao defenderem o organismo, regulam o processo inflamatório e induzem imunidade (71).

Na medula óssea, os monócitos são leucócitos que derivam das células progenitoras mielo-monocíticas que dão origem a precursores como os monoblastos e os promonócitos. Esta população está presente em todos os vertebrados, constituindo cerca de 3% das células nucleadas da medula óssea e caracteriza-se pela sua capacidade fagocítica, produção de citocinas e apresentação de antígenos. A diferenciação e maturação ocorre entre 50 a 60 horas, permanecendo no sangue entre 8h-72h. Estão em maior quantidade no fígado e nos pulmões, sendo rapidamente mobilizados se necessário. Quando em circulação, os monócitos são recrutados aos locais de inflamação onde são activados, diferenciando-se em macrófagos. Estas células perdem as características de monócitos, tornam-se células de maiores dimensões, especialistas em fagocitar, e consequentemente na apresentação antigénica. Os monócitos/macrófagos são multifuncionais, desempenhando funções na homeostasia, resposta imune e reparação de tecidos, contribuem também para a angiogénese e arteriogénese (72) e expressam um transcriptoma muito diverso (73). Sob efeito de *stress* ou exercício físico o número de monócitos em circulação aumenta em poucos minutos, regressando ao nível basal de forma igualmente rápida.



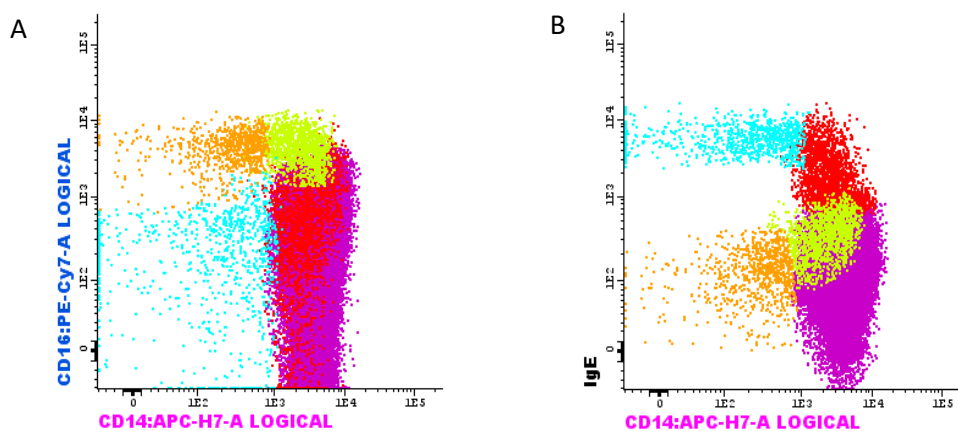
**Figura 7 Nomenclatura dos monócitos no sangue. As três subpopulações apresentam diferentes símbolos, representando receptores próprios dessas populações. O gancho azul representa o CD14; A bandeira laranja o CD16. (Blood Journal, vol 116, number 6, 74-78 [2010])(84)**

Inicialmente, os monócitos eram identificados pela sua função e morfologia. Actualmente utilizam-se marcadores de superfície celular, de modo a identificar com maior precisão os monócitos e as suas diferentes subpopulações, como por exemplo, o CD14 (74). Mais recentemente, e com base na expressão diferencial de CD14 e CD16, é possível identificar, definir, enumerar e isolar diferentes populações de monócitos como mostra a figura 8.

A maior população de monócitos, constituindo 90-95%, apresenta-se como CD16<sup>-</sup> CD14<sup>high</sup>, produzem MCP-1/CCL 2 e expressam CCR2 (importante na migração), designando-se de monócitos clássicos. A população CD16<sup>+</sup> CD14<sup>-</sup> é caracterizada pela expressão elevada de moléculas de MHC classe II e produção elevada de TNF- $\alpha$  quando activadas através de TLRs e são designadas de monócitos não-clássicos. Estes são mais pequenos em tamanho e complexidade, mobilizando-se facilmente. A terceira população de monócitos apresenta uma expressão intermédia de CD16<sup>+</sup> e é CD14<sup>+</sup> e são denominados de monócitos intermédios. Apesar de se encontrarem numa frequência baixa, esta subpopulação apresenta características únicas, expandindo em função da presença de algumas citocinas e em inflamação (75–77). Os monócitos não clássicos e os intermédios constituem cerca 5-10% da população de monócitos em condições não patológicas. Os monócitos CD16<sup>+</sup> expandem durante infecções, doenças autoimunes e em determinados tumores, tais como do cólon, gástrico e mama (78). Estudos evidenciam a eficácia do CD16, sob activação por IFN- $\gamma$  ou DAMPs, na mediação da actividade ADCC (citotoxicidade celular dependente de anticorpos), contra uma grande variedade de células. A capacidade fagocítica é maior nos monócitos clássicos e nos intermédios (79).

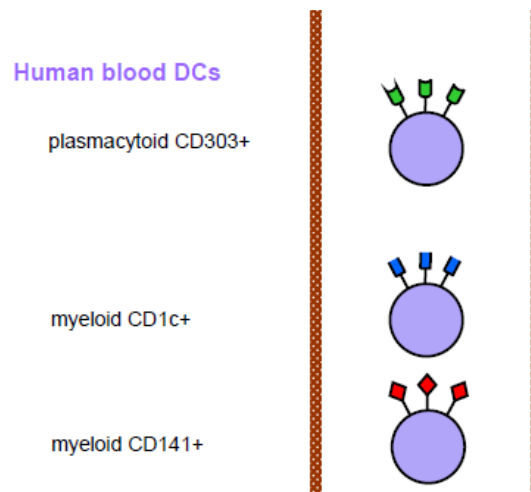
Existem, no entanto, outras populações de monócitos que vão surgindo, em diferentes estudos, estando uma delas relacionada com o receptor de alta afinidade para a IgE. O Fc $\epsilon$ RI é expresso constitutivamente em mastócitos, basófilos, células dendríticas plasmacitóides e

células dendríticas mielóides, sendo capaz de se ligar à IgE. Quando formado o complexo FcεRI /IgE é activada uma série de cascatas de sinalização que resultam na libertação de mediadores inflamatórios, como a histamina. A expressão de FcεRI em monócitos foi primeiramente caracterizada numa pequena subpopulação CD2<sup>+</sup> e CD16<sup>-</sup>, representando apenas 5% da população total de monócitos no sangue periférico (80). Estudos demonstraram que os monócitos CD2<sup>+</sup> obtidos em cultura apresentavam características semelhantes às das CDs dos tecidos periféricos (81,82). Desta forma especula-se que a subpopulação de monócitos que expressa FcεRI sejam os precursores periféricos das DCs. As diferentes subpopulações de monócitos descritas estão representadas na figura 8, bem como as células dendríticas.



**Figura 8 Ilustração da estratégia utilizada na definição das diferentes populações de monócitos e células dendríticas em humanos, baseada na expressão relativa de CD16 e CD14 em A e IgE e CD14. A azul temos as CDs; cor de rosa monócitos clássicos, laranja os monócitos não clássicos, a verde monócitos intermédios e a vermelho os monócitos com expressão de**

As células dendríticas foram primeiramente descritas por Steinman and Cohn. Estas células fazem a ponte entre o sistema inato e adaptativo, sendo altamente imunogénicas sob condições inflamatórias. À semelhança dos monócitos, as células dendríticas são células apresentadoras de antígenos profissionais, especializadas na sua captura, processamento e apresentação às células T, conduzindo a diferentes tipos de respostas imunes. Durante estes anos, foi discutido se estas células pertenciam à linhagem mielóide ou se faziam parte do sistema mononuclear fagocítico devido à sua heterogeneidade. As diversas subpopulações de DCs distinguem-se pelas suas propriedades funcionais e fenotípicas (83). São frequentemente descritas 3 subpopulações de células dendríticas: as plasmacitóides, que se caracterizam pela forte expressão de CD123<sup>+</sup>, possuindo uma grande capacidade de produção de IFN- $\alpha$ , em resposta a vírus, bem como de outras citocinas inflamatórias, e duas subpopulações mielóides: CD1c + e CD141+ já que ambas apresentam marcadores de linha mielóide, como o CD33 e CD13 (84).



**Figura 9** Nomenclatura das células dendríticas no sangue. As três subpopulações apresentam diferentes símbolos, representando receptores próprios dessas populações. A verde o CD303; a azul o CD1c a vermelho o CD141. (BloodJournal, vol 116, number 6, 74-78 [2010])(84)

### 3.3 Alterações funcionais e fenotípicas de Monócitos e células dendríticas em doenças do SNC e autoimunes

A investigação de alterações no sistema imunitário em SCZ, apesar de existir há décadas, começou a ter maior interesse devido aos estudos recentes que indicam uma correlação/interação entre o sistema imunitário e o cérebro em diversas doenças mentais crónicas.

Na doença de Parkinson, com base no transcriptoma, verificou-se que os monócitos apresentam uma predisposição para a inflamação, ocorrendo uma desregulação pró-inflamatória nas diversas subpopulações. Funcionalmente, estes comportam-se de maneira diferente, apresentando, nomeadamente, alterações na sua função fagocítica. Sabendo que os macrófagos, derivados de monócitos no SNC são responsáveis pela resolução da neuroinflamação através da fagocitose de componentes celulares mortos, a redução da sua capacidade fagocítica torna-se problemática, contribuindo para a fisiopatologia da doença. Num estudo efectuado, verificou-se que os monócitos se encontravam permanentemente activados, produzindo citocinas que contribuem para a inflamação verificada, sendo que, mesmo após estimulação, os mesmos respondem, tornando-se hiperactivados, contribuindo para uma maior severidade da doença (85). Ainda ao nível do SNC na doença de Alzheimer, ocorre um estado de inflamação intenso, levando a um aumento de citocinas quer no SNC quer a nível periférico. Também se verifica um aumento da população de monócitos no sangue periférico, em doentes, quando comparados com controlos, bem como da frequência destas

células a produzir citocinas, tais como, IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-12 e TNF- $\alpha$ , reforçando a existência de um estado de inflamação crónica na doença (86). Estudos efectuados em esclerose múltipla revelaram um aumento da produção de IL-12 e IL-6 pelos monócitos do sangue periférico dos doentes, comparando com controlos, podendo desta forma contribuir para a perpetuação da inflamação verificada na EM (87).

## *Objetivos*

#### 4. Objectivos

A pesquisa de biomarcadores periféricos em determinadas doenças torna-se uma ferramenta potente, de modo a potenciar a sua prevenção, antecipar o diagnóstico e melhorar a eficácia do tratamento. Existem evidências claras da desregulação do sistema imune periférico em doenças neurodegenerativas, que apesar de ainda não estar completamente documentada na esquizofrenia, parece também assumir um papel importante. A maioria dos estudos efectuados nesta doença, incidem sobre os mecanismos patológicos ao nível do SNC, sendo inegável a importância da microglia, dos astrócitos e dos neurónios, nomeadamente pela produção de citocinas.

O principal objectivo desta tese é quantificar e analisar fenotípica e funcionalmente as diferentes subpopulações de monócitos (clássicos, intermédios, não clássicos e que expressam o FcεRI) e as populações de células dendríticas (mielóides e plasmacitóides), num grupo controlo, num grupo de doentes com esquizofrenia em fase aguda, após um episódio de surto psicótico, e numa fase inicial da doença (Psicose Aguda e Transitória), de modo a verificar se essas populações se encontram alteradas, podendo desta forma constituírem um bom alvo de estudo para a monitorização da evolução da doença.



## *Material e Métodos*

## 5. Material e Métodos

### 5.1 Grupos de estudo

O objectivo do estudo consiste na caracterização de populações celulares do sangue periférico na doença de SCZ. Para tal, foram constituídos dois grupos de doentes no estudo. Um grupo de indivíduos em psicose aguda, após um surto psicótico, sem qualquer influência de tratamento e um grupo com psicose inicial (Aguda e Transitória), que corresponde aos mesmos doentes mas num segundo momento, sob influência de tratamento, nomeadamente antipsicóticos. Foi também constituído um grupo controlo (CTR), com uma média de idades semelhante aos doentes em estudo, mas sem evidência de processo inflamatório e sem história de doença auto-imune, alérgica e neoplásica, bem como, sujeitos a medicação que pudesse alterar as variáveis do estudo. A caracterização da doença foi efectuada segundo o ICD-10 (*International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problem 10th Revision, version 2016, Health Word Organization*).

**Tabela 1 Características clínicas dos doentes no estudo e dos controlos**

	CTR (n=10)	Média	Desvio Padrão	Surto Psicótico (n=17)	Médi a	Desvio Padrão	Psicose Inicial (n=6)	Médi a	Desvio Padrão
<b>Género</b>									
Feminino	3			3			2		
Masculino	7			14			4		
<b>Idade</b>		30	±2		27	±2		26	±2
<b>Tratamento</b>									
<b>Antipsicóticos</b>							<b>6</b>		
Risperidona							3		
Paliperidona							2		
Olanzapina							1		
Clozapina							1		
<b>Estabilizador de Humor</b>							<b>1</b>		
Valproato							1		
<b>Benzodiazepina</b>							<b>3</b>		
Lorazepam							1		
Diazepam							1		
Alprazolam							1		

## 5.2 Ética

O estudo foi aprovado pelo Comité de Ética dos CHUC. Todos os participantes leram e assinaram o consentimento informado, tendo sido respeitados todos os princípios da “Declaração de Helsínquia”.

## 5.3 Recolha das amostras

A recolha das amostras foi assegurada pelo Hospital Universitário de Coimbra e pelo Hospital do Sobral Cid sob a coordenação da equipa do serviço de psiquiatria.

Com o objectivo de estudar as células do sistema imune periférico foram recolhidos 15mL de sangue a cada indivíduo, sendo que 9mL foram colocados num tubo de etilenodiaminotetracético dipotássio (K2E K2EDTA), e os restantes 6mL para um tubo de heparina-lítio (LH).

## 5.4 Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica capaz de analisar de forma rápida e eficiente múltiplos parâmetros em células individuais. Ao longo dos anos tornou-se numa ferramenta fundamental para o diagnóstico clínico, e bastante útil na investigação biomédica.

A citometria de fluxo consiste na passagem de um feixe de luz por milhares de células por segundo, onde a luz emitida por cada célula é capturada. Os resultados obtidos são analisados por um *software* próprio, onde se determinam as diferentes características celulares: tamanho, complexidade e a expressão de diferentes proteínas na membrana, citoplasma ou no núcleo, entre outras.

### 5.4.1 Quantificação das diferentes populações de monócitos e de células dendríticas

Com o objectivo de quantificar e caracterizar fenotipicamente as diferentes populações de monócitos e células dendríticas do sangue periférico, efectuou-se a marcação directa, utilizando anticorpos monoclonais, de acordo com o seguinte procedimento. Pipetou-se 100 $\mu$ L de sangue periférico (aproximadamente  $2 \times 10^6$  células). De seguida procedeu-se à incubação com os vários anticorpos monoclonais cujo volume e fluorescência usado se encontra descrito na tabela 2. Incubou-se 10 minutos à temperatura ambiente no escuro. Efectou-se a lise dos

eritrócitos com 2mL de FACS Lysing Solution, previamente diluída a 1:10 (Becton Dickinson Biosciences, U.S.A.) com água destilada. Centrifugou-se a 540xg durante 5 minutos e decantou-se o sobrenadante. Por fim adicionou-se 1 mL de PBS, um tampão fosfato salino, (GIBCO, U.S.A.), previamente diluído a 1:10 em água destilada. Centrifugou-se a 540xg durante 5 minutos. Decantou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se com 250µL de PBS (1x). Por fim adquiriram-se as amostras no citómetro de fluxo BD FACSCanto II (BD Biosciences, San jose, CA. U.S.A.).

**Tabela 2 Combinação de anticorpos utilizados na marcação do tubo 1 de citometria e respectiva informação de fluorescência, clone e volume**

	V450	V500	PE (Ficoeritrina)	PE-cy 7 (Ficoeritrina Cianina 7)	APC (Alofocianina)	APC-H7 (Alofocianina H7)
<b>Tubo 1</b>	HLA-DR	CD45	IgE	CD16	CD33	CD14
<b>Clone</b>	L243	2D1	BE5	3G8	P67.6	MφP9
<b>Volume</b>	2µL	2µL	2 µL	2 µL	2,5 µL	2,5 µL

#### 5.4.2 Quantificação da frequência de monócitos e células dendríticas produtoras de TNF- $\alpha$ e IL-6

Para quantificar a frequência de monócitos e células dendríticas produtoras de TNF- $\alpha$  e IL-6, bem como a quantidade dessas citocinas intracelulares, em doentes e controlos, efectuou-se a activação *in vitro* com LPS ( do inglês *lipopolysaccharide*) e IFN- $\gamma$  recombinante, segundo o seguinte procedimento. Efectou-se a diluição de 1/1 de 500 µL amostra de sangue periférico em 500 µL de meio RPMI-1640. A esta solução pipetou-se Brefeldina A (10 µg/ml) (Sigma), a fim de prevenir a libertação de citocinas produzidas durante a cultura pelas células, estimulando com LPS (100 ng/ml) de *Escherichia coli* (serotype 055:B5, Sigma), e IFN- $\gamma$  recombinante (100 U/ml, Promega, Madison, USA). Homogeneizando bem a amostra, colocou-se a incubar durante 6h, à temperatura de 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>

Após o período de incubação procedeu-se à análise imunofenotípica dos monócitos e mCDs activados. Efectuou-se a marcação directa, utilizando 2 combinações de 6 e 7 anticorpos monoclonais, de acordo com o seguinte procedimento. Pipetou-se 300µL da amostra (aproximadamente 3x10<sup>6</sup> células) para cada tubo de citometria. De seguida procedeu-se à incubação das amostras com os vários anticorpos monoclonais que reconhecem proteínas da

membrana celular, cujo volume e fluorescência usado se encontra descrito na tabela 3. Incubou-se 10 minutos à temperatura ambiente no escuro. Após a incubação, adicionou-se 1mL de PBS e centrifugou-se a 540xg durante 5 minutos. Decantou-se o sobrenadante e efectuou-se a permeabilização e fixação da amostra, recorrendo à solução A e B, respectivamente, do Kit Fix and Perm Cell Permeabilization (Life Technologies Corp. frederick MD 21704, U.S.A.). Entre as duas soluções fez-se uma lavagem com 1mL de PBS, com posterior centrifugação 540xg durante 5 minutos e decantação. Após colocada a solução B, adicionaram-se os anticorpos monoclonais anti-TFN- $\alpha$  e IL-6 (sinalizados com \* como sendo os anticorpos intracelulares na tabela 3), deixando a incubar durante 15 minutos. Por fim adicionou-se 1mL de PBS, centrifugou-se a 540xg durante 5 minutos e decantou-se o sobrenadante. Repetiu-se novamente este último passo e após a decantação do sobrenadante, ressuspendeu-se com 250 $\mu$ L de PBS (1x). Por fim adquiriram-se as amostras no citómetro de fluxo.

**Tabela 3 Combinação de anticorpos utilizados na marcação dos tubos 2 e 3 de citometria e respectiva informação de fluorescência, clone e volume.**

	V450	V500	PE (Ficoeritrina)	PE-cy 7 (Ficoeritrina Cianina 7)	APC (Aloficocianina)	APC-H7 (Aloficocianina H7)	FITC (Isotiocianato)
<b>Tubo 2</b>	HLA-DR	CD45	IgE	CD16	CD33	CD14	TNF- $\alpha$ *
<b>Clone</b>	L243	2D1	BE5	3G8	P67.6	M $\phi$ P9	Mab11
<b>Volume</b>	2 $\mu$ L	2 $\mu$ L	2 MI	2 $\mu$ L	2,5 $\mu$ L	2,5 $\mu$ L	1,5 $\mu$ L
<b>Tubo 3</b>	HLA-DR	CD45	IL-6*	CD16	CD33	CD14	
<b>Clone</b>	L243	2D1	M $\phi$ 2-6 <sup>a</sup> 3	3G8	P67.6	M $\phi$ P9	
<b>Volume</b>	2 $\mu$ L	2 $\mu$ L	10 $\mu$ L	2 $\mu$ L	2,5 $\mu$ L	2,5 $\mu$ L	

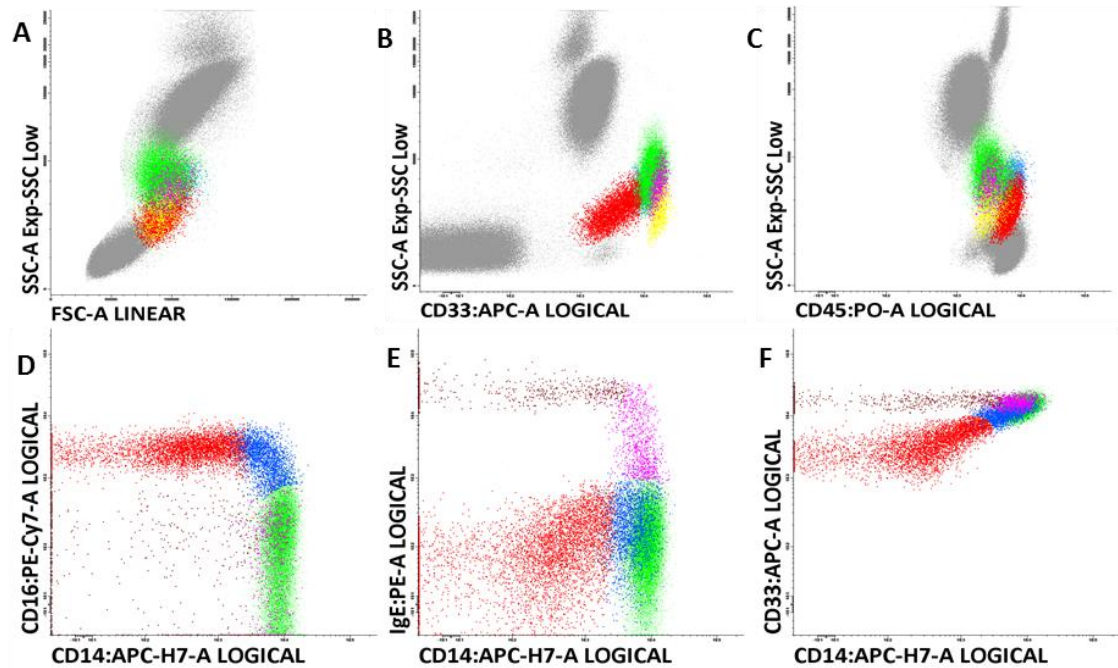
#### 5.4.3 Aquisição de dados por citometria de fluxo e análise

Aquisição de dados foi realizada no citómetro de fluxo, usando o *software* BD FACSDiva V8.0.1 (Becton Dickinson; 2016). Os eventos foram adquiridos até se esgotar a amostra.

Para análise dos resultados obtidos por citometria de fluxo utilizou-se o *software* Infinicyt 1.7 (Cytognos, Salamanca, Espanha). A produção de TNF- $\alpha$  e IL-6 foi avaliada com base na frequência (%) de células positivas para estes anticorpos em cada subpopulação do estudo, e a sua respectiva expressão foi determinada pela Média de Intensidade de Fluorescência (MIF).

Durante a estimulação por LPS o CD16 é perdido, como já foi reportado noutros artigos (89,90) desta forma a identificação das subpopulações de monócitos foi efectuada com base

nos marcadores CD33, HLA-DR e CD14 e IgE, uma vez que estes se mantêm intactos durante o período de estimulação. Utilizando os anticorpos CD16, CD14, CD33, HLA DR e CD45 é possível distinguir as populações de monócitos clássicos, não clássicos e intermédios, como mostra a figura apresentada em baixo (91). Por sua vez, o anticorpo IgE, permite distinguir a subpopulação de monócitos que expressam o seu receptor de alta afinidade FcεRI e as de células dendríticas mielóides (mCDs) e as células dendríticas plasmacitóides (pCDs).



**Figura 10** Estratégia para a identificação das diferentes subpopulações de monócitos e de células dendríticas mielóides. Os monócitos e as células dendríticas são selecionados a partir do gate do forward scatter (FSC), side scatter (SSC), CD33 e CD45 (a-c). No d temos o gate convencional que permite identificar as diferentes populações através da expressão de CD16 e CD14. Após a activação o CD16 perde-se, pelo que se usa a combinação de CD33 com CD14 de modo a distinguir os monócitos clássicos e não-clássicos (f). A população de intermédios por sua vez é mais difícil de identificar aquando da estimulação. A vermelho temos os monócitos não clássicos; verde os monócitos clássicos; azul os monócitos intermédios; rosa os monócitos IgE; amarelo em A,B e C e castanho escuro em D, E e F as células dendríticas mielóides.

Os valores absolutos foram calculados utilizando uma dupla metodologia: citometria de fluxo e contador hematológico.

#### 5.4.4 Cell Sorting

Para o cell sorting de monócitos por amostra foi seguido o seguinte procedimento. Pipetou-se 5mL de sangue periférico do tubo de heparina e lítio para um falcon de 50mL. De

seguida fez-se o volume do falcon com a solução de NH<sub>4</sub>Cl (Sigma, San Luis, Califórnia) para lise dos glóbulos vermelhos. Após 20 minutos de incubação, centrifugou-se a 540xg durante 5 minutos e recorrendo a uma pipeta de pasteur extraiu-se o sobrenadante, deixando o pellet no fundo do tubo para marcação com anticorpos. A incubação das amostras com os vários anticorpos monoclonais, cujo volume e fluorescência usado se encontra na tabela X, foi efectuada à temperatura ambiente no escuro durante 20 minutos. Por fim adicionou-se 50 mL de PBS, um tampão fosfato salino, (Phosphate Buffer Saline – PBS, pH=7.4, 10x, GIBCO, U.S.A.), previamente diluído a 1:10 em água destilada e centrifugou-se a 540xg durante 5 minutos. Decantou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se com 250µL de PBS. Todos os anticorpos são da BD Biosciences, San jose, CA. U.S.A; excepto IgE, da Exbio pharma, República Checa.

Para o sorting de monócitos recorreu-se ao citómetro FACSAria II flow cytometer (BD), usando o *software* FACSDiva (BD Biosciences).

**Tabela 4 Anticorpos usados na análise para o *cell sorting* e a respectiva empresa, volume e fluorescência.**

	V500	PE
	(Ficoeritrina)	
<b>Tubo 1</b>	CD45	CD33
<b>Clone</b>	2D1	D3HL60.251
<b>Volume</b>	2µL	10 µL

Às populações purificadas foram adicionados 350µL de solução buffer RLT (*RNeasy Micro Kit*, Quiagen, Germany) e armazenadas a -20°C.

#### 5.5 Avaliação da expressão génica de BDNF e CCL11

O gene de referência (*Housekeeping*) utilizado foi *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)*, para os monócitos foi avaliada a expressão do gene *BDNF* e *CCL11*. Os conjuntos de primers que permitiram a expressão dos genes estão representados na Tabela 5.

##### 5.5.1 Extração de mRNA e Transcrição Reversa

Para a extração de mRNA total foi realizado o protocolo do *RNeasy Micro Kit* (Quiagen, Germany), seguindo as instruções do fabricante. Após a extração a amostra foi armazenada a -

80°C. Por sua vez, a transcrição reversa do mRNA foi efectuada segundo o protocolo do *KIT High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems, USA).

### 5.5.2 PCR em tempo real

A quantificação relativa da expressão génica por PCR em tempo real (qRT-PCR) foi realizada no *Bio-Rad CFX Manager (CFX96 Real Time System C100 Thermal Cycler, California)*. Para as reacções de qRT-PCR utilizou-se a *Supermix SsoFast™ EvaGreen®* (Bio-rad Laboratories, California), 300nM de primer e 2µL de amostra de cDN. A reacção de qRT-PCR está representada na Tabela 6.

**Tabela 5 Conjunto de primers (Forward e Reverse) e temperaturas de annealing utilizadas para a expressão dos genes GAPDH, BDNF e CCL11**

Gene	Primers	Temperatura de Annealing (°C)
<b>GAPDH</b>	Forward 5'AAGGTGAAGGTCGGAGTCAAC3'	60
	Reverse 5'CAGAGTTAAAAGCAGCCCTGGT3'	
<b>BDNF</b>	Forward 5'GATGCTGCAAACATGTCCATGA3'	62.2
	Reverse 5'TAATACTGTCACACGCTCAGCTC'	
<b>CCL11</b>	Forward 5'CCCTCAGCGACTAGAGAGC3'	58
	Reverse 5'CTTGAAGATCACAGCTTCTGGGG3'	

**Tabela 6 Perfil da reacção de qRT-PCR utilizado para a expressão dos genes em estudo.**

Etapa	Ativação da polimerase	PCR	
		Desnaturação	Annealing/ Extensão
	Aquecimento	50 Ciclos	
<b>Temperatura</b>	95°C	95°C	Dependente dos primers
<b>Tempo</b>	2 Min.	15 Seg.	1 Min.

Foram efectuadas diluições de uma mesma amostra de modo a obter uma curva de calibração para cada gene, retirando o valor do declive da recta, bem como a equação da reacção. A validação do processo foi garantida através de valores de eficiência semelhantes



entre a expressão de gene GAPDH e os genes de interesse (BDNF e CCL11). Os resultados obtidos foram calculados usando o método de comparação de Ct ( $\Delta\Delta CT$ ).

Estes dados foram usados para a análise dos resultados de PCR dos genes alvo nas amostras em questão.

## 5.6 Análise Estatística

Os resultados obtidos foram apresentados graficamente recorrendo ao *software* GraphPad Prism, Versão 6.0, e para as análises estatísticas descritivas e inferenciais foi utilizado o software de análise IBM SPSS Statistics, versão 23.0 (Statistical Package for Social Sciences IBM, Armonk, NY. USA). Para o estudo da IL-6 foram usadas apenas 15 amostras, pela existência de dois valores omissos nessa variável (11.8%), os quais foram substituídos pela respetiva média distribucional (num estudo de simulação este procedimento revelou-se adequado na presença de 10.% de valores omissos (92)).

Quer nos resultados obtidos por citometria de fluxo, quer nos resultados obtidos pela expressão génica, a normalidade, para cada variável dependente, foi testada através do teste de Shapiro-Wilk, e para a homocedasticidade foi usado o teste de Levene. Nem todas as amostras apresentam uma distribuição normal, contudo já se demonstrou que os testes paramétricos são bastantes robustos à violação destes pressupostos (5), tais como o teste de ANOVA. Desta forma, considerando a reduzida dimensão da amostra e algumas violações à distribuição normal da amostra (teste de Shapiro-Wilk,  $p < .059$ ), foi efectuado o teste  $F$  de Fisher-Snedecor através da opção Modelo Geral Linear no SPSS para obter a magnitude de efeito e a potência estatística observada do teste, e na ocorrência de heterocedasticidade (teste de Levene  $p < 0.05$ ), foi usada a ANOVA de Welch. Para as seis amostras empilhadas foi efectuada uma análise posterior, utilizando o teste de Wilcoxon, a fim de comparar estes doentes nos dois momentos diferentes do estudo: surto psicótico (sem influência de tratamento) e na fase inicial da psicose inicial (sob tratamento de antipsicóticos). Os resultados com valores de  $p < 0.05$  foram considerados indicativos de diferenças estatisticamente significativas.

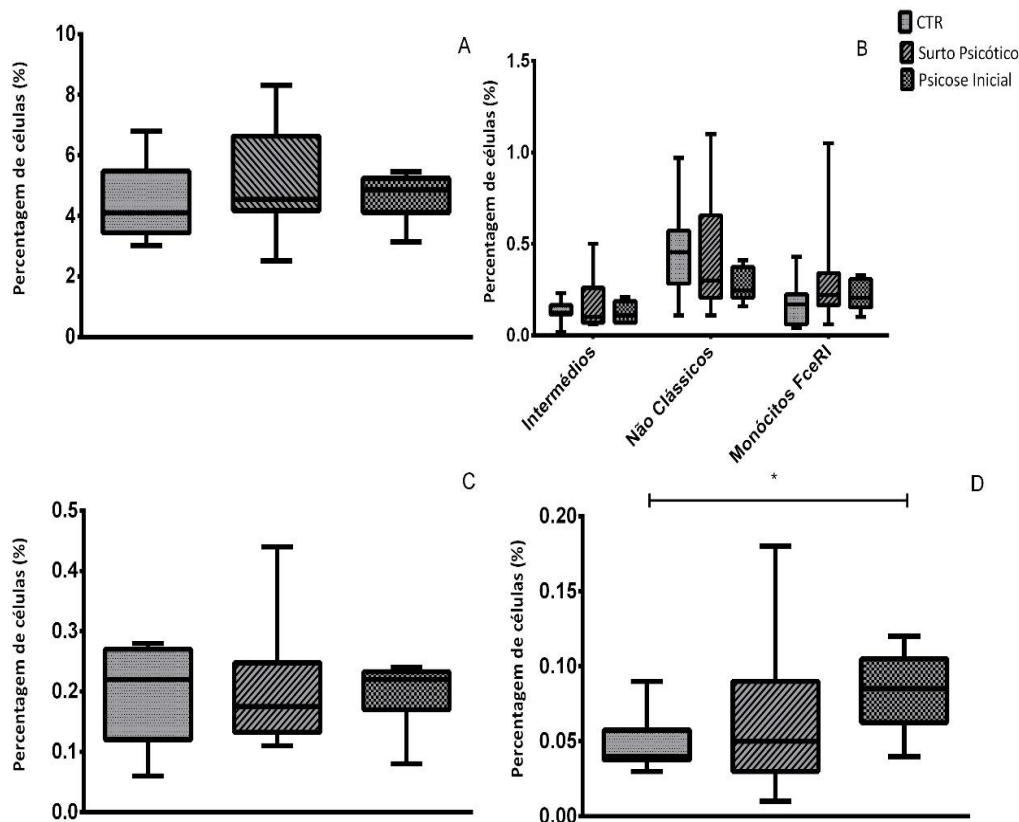
## *RESULTADOS*

## 6 Resultados

### 6.1 Avaliação da percentagem e valores absolutos das diferentes populações de monócitos e células dendríticas

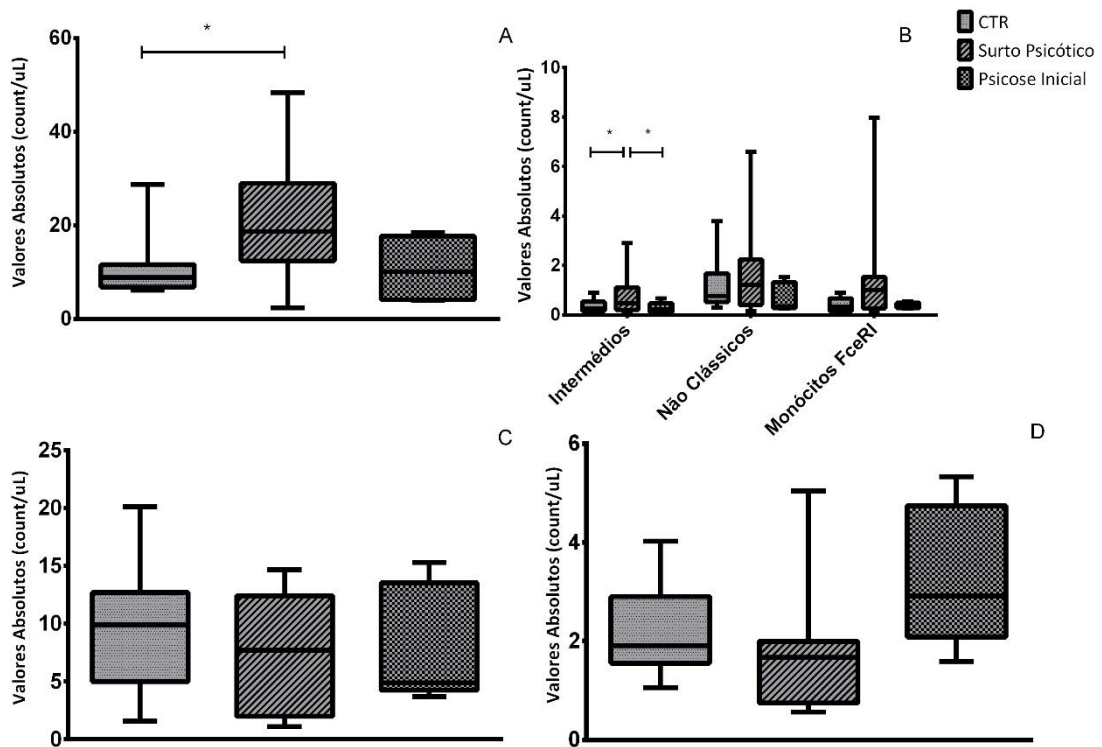
Procedeu-se à quantificação das diferentes populações de monócitos e células dendríticas do sangue periférico nos diferentes grupos em estudo. Avaliou-se a percentagem de cada população celular estudada relativa à celularidade global da amostra (dentro de todos os leucócitos); a percentagem de cada subpopulação de monócitos relativa à população total de monócitos, procedendo-se também à quantificação dos valores absolutos para todas as populações estudadas (número de células por microlitro de sangue periférico).

Parece ocorrer uma diminuição da percentagem de monócitos não clássicos e um aumento dos monócitos com IgE ligada ao seu receptor de alta afinidade nos grupos de esquizofrenia, embora ambos sem significado estatístico. Ocorre um aumento estatisticamente significativo da frequência de células dendríticas plasmacitóides no grupo em psicose inicial e não se verificam alterações nas restantes células do estudo (**Figura 11**)



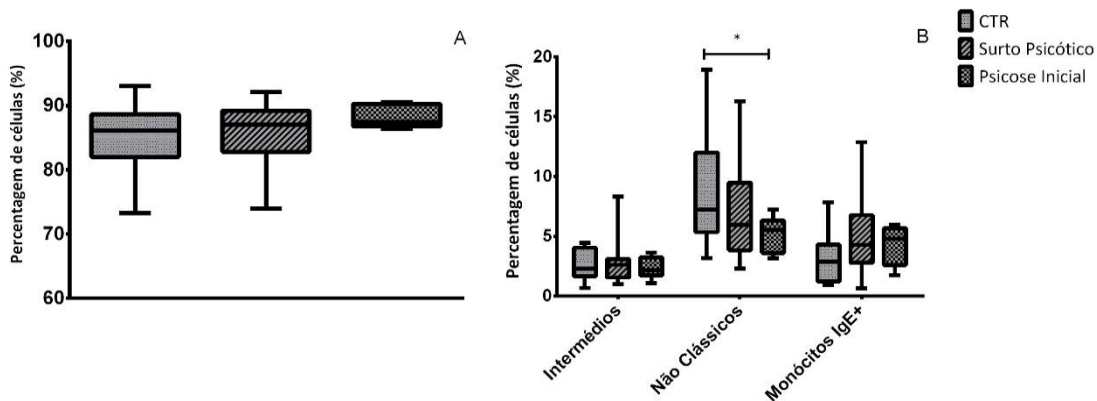
**Figura 11** Percentagem de monócitos clássicos (A); de monócitos intermédios, não clássicos e que expressam FcεR (B); de células dendríticas mielóides (C) e de células dendríticas plasmacitóides (D) do sangue periférico nos diferentes grupos de estudo. As diferenças estatisticamente significativas  $p < 0.05$  são representadas por um \*.

Nos valores absolutos, verificou-se um aumento estatisticamente significativo dos monócitos clássicos e intermédios nos doentes em surto psicótico e, ainda que não sejam estatisticamente significativos, observou-se um aumento dos monócitos com IgE ligada ao seu receptor de alta afinidade. De forma similar ao observado para a percentagem ocorre um aumento do valor absoluto das células dendríticas plasmacitóides no grupo psicose inicial, embora sem significado estatístico (**Figura 12**).



**Figura 12** Valores absolutos (número de células por microlitro de sangue) de monócitos clássicos (A); monócitos intermédios, não clássicos e que expressam FcεR (B); células dendríticas mielóides (C) e células dendríticas plasmacitóides (D) nos diferentes grupos de estudo. As diferenças estatisticamente significativas  $p < 0.05$  são representadas por um \*.

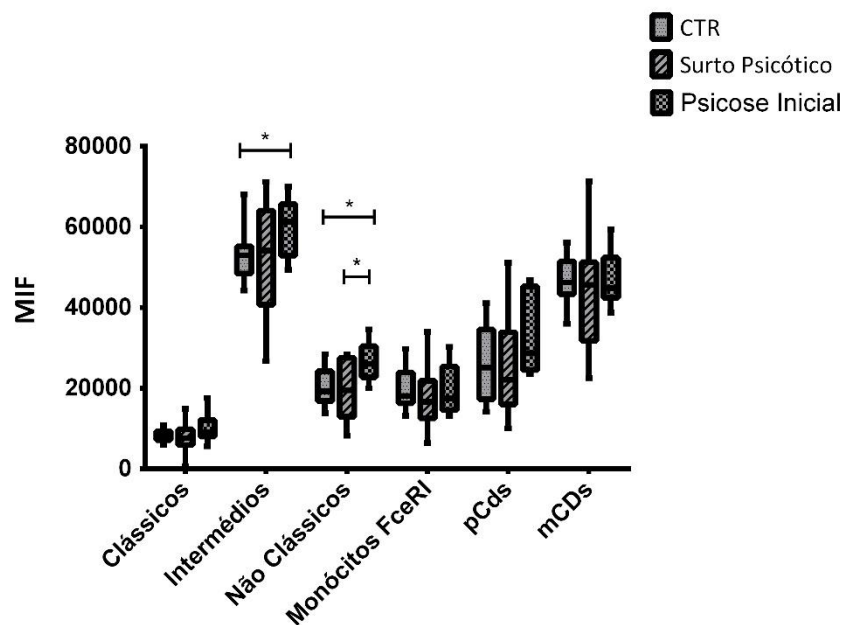
À semelhança do que se tinha observado na percentagem em relação à celularidade global, os monócitos não clássicos apresentam uma diminuição da percentagem obtida dentro da população de monócitos totais (**Figura 13**), desta vez com significado estatístico entre os grupos controlo e psicose inicial.



**Figura 13** Percentagem total das diferentes subpopulações de monócitos: clássicos (A), intermédios, não clássicos e IgE (B) nos diferentes grupos em estudo. Os resultados estão expressos em percentagem total de células (%) relativamente à percentagem de monócitos no sangue periférico. As diferenças estatisticamente significativas  $p < 0.05$  são representadas por um \*.

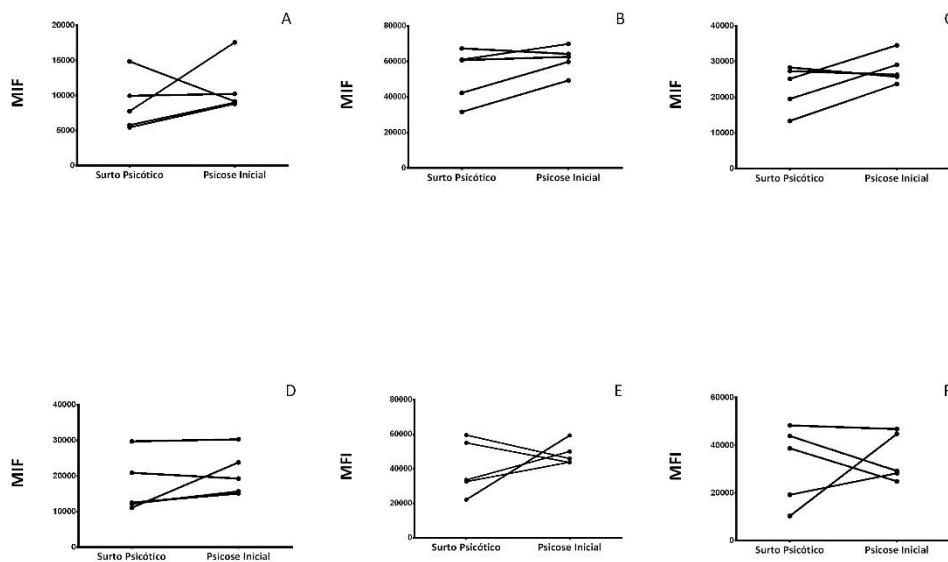
## 6.2 Expressão de HLA-DR

Na expressão HLA-DR (dada pela MIF) verificou-se um aumento desta nas diferentes subpopulações de monócitos e nas células dendríticas plasmacitóides nos grupo de doentes em psicose inicial, atingindo significado estatístico nos monócitos intermédios e não clássicos.



**Figura 14** Média de Intensidade de Fluorescência (MIF) de HLA-DR pelas diferentes populações de monócitos, células dendríticas mielóides e células dendríticas plasmacitóides. Os resultados estão expressos em intensidade média de fluorescência. As diferenças estatisticamente significativas  $p < 0.05$  são representadas por um \*.

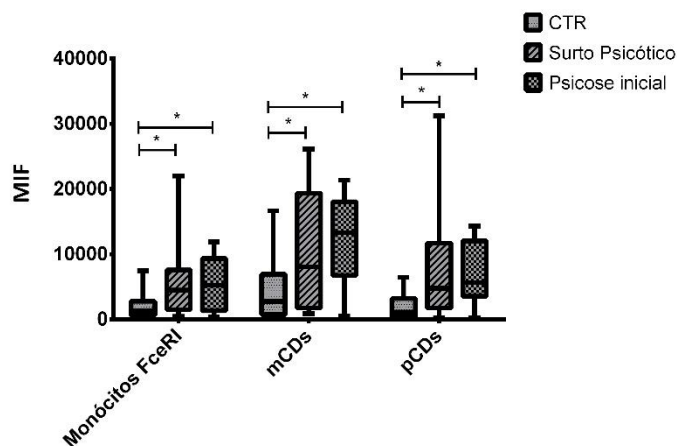
De modo a compreender melhor os resultados da expressão de HLA-DR, verificámos a relação existente entre as amostras emparelhadas, entre o grupos de doentes em surto e o grupo de doentes em psicose inicial (sem estarem em surto) (n=5) (**Figura 115**). De facto, observa-se um aumento da expressão de HLA-DR, nos doentes fora do surto, nos monócitos intermédios e não clássicos em 3 dos 5 dos casos estudados.



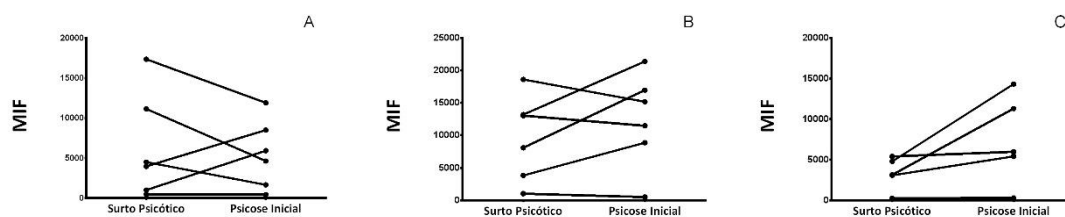
**Figura 115** Média de Intensidade de Fluorescência (MIF) de HLA-DR pelas diferentes populações de monócitos, monócitos clássicos (A), monócitos intermédios (B), monócitos não clássicos (C), monócitos que expressam FcεRI (D) e células dendríticas mielóides (E), células dendríticas plasmacitóides (F) expressos em percentagem de células, nas amostras emparelhadas entre o grupo de doentes em surto e o grupo de doentes com psicose inicial. As diferenças estatisticamente significativas  $p < 0.05$  são representadas por um \*.

### 6.3 Frequência de IgE ligada ao seu receptor de alta afinidade nos monócitos que expressam FcεRI, mCDs e pCDs

Verifica-se um aumento estatisticamente significativo da expressão de IgE ligada ao seu receptor de alta afinidade em SCZ quando comparado com controlos (**Figura 16**), parecendo este ser mais acentuado no grupo em psicose inicial, nomeadamente nas células dendríticas mielóides. A **Figura 17** mostra que esse aumento entre surto e não surto não ocorre em todos os doentes (n=6).



**Figura 16** Média de Intensidade de Fluorescência (MIF) de IgE pelas diferentes populações de monócitos, células dendríticas mielóides e células dendríticas plasmacitóides. Os resultados estão expressos em intensidade média de fluorescência. As diferenças estatisticamente significativas  $p < 0.05$  são representadas por um \*.



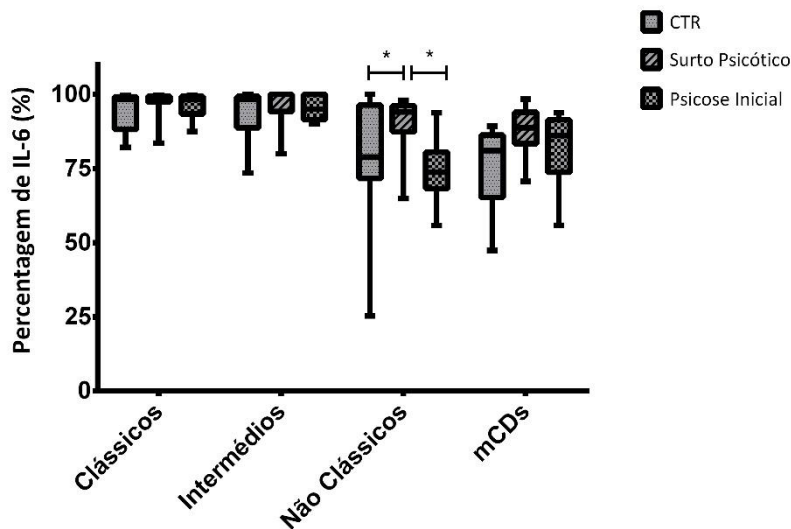
**Figura 17** Média de Intensidade de Fluorescência (MIF) de IgE nos monócitos que expressam FcεRI (A), células dendríticas mielóides (B) e células dendríticas plasmacitóides (C) expressos em percentagem de células, nas amostras emparelhadas entre o grupo de doentes em surto e o grupo de doentes com psicose inicial. As diferenças estatisticamente significativas  $p < 0.05$  são representadas por um \*.

#### 6.4 Quantificação da frequência de monócitos e células dendríticas produtoras de TNF- $\alpha$ ou IL-6 após activação *in vitro*

Para quantificar a frequência de monócitos e células dendríticas produtoras de IL-6 ou TNF- $\alpha$ , bem como a quantidade dessas citocinas intracelulares ao nível de cada célula, em doentes e controlos, efectuou-se a activação *in vitro* com LPS e IFN- $\gamma$  recombinante.

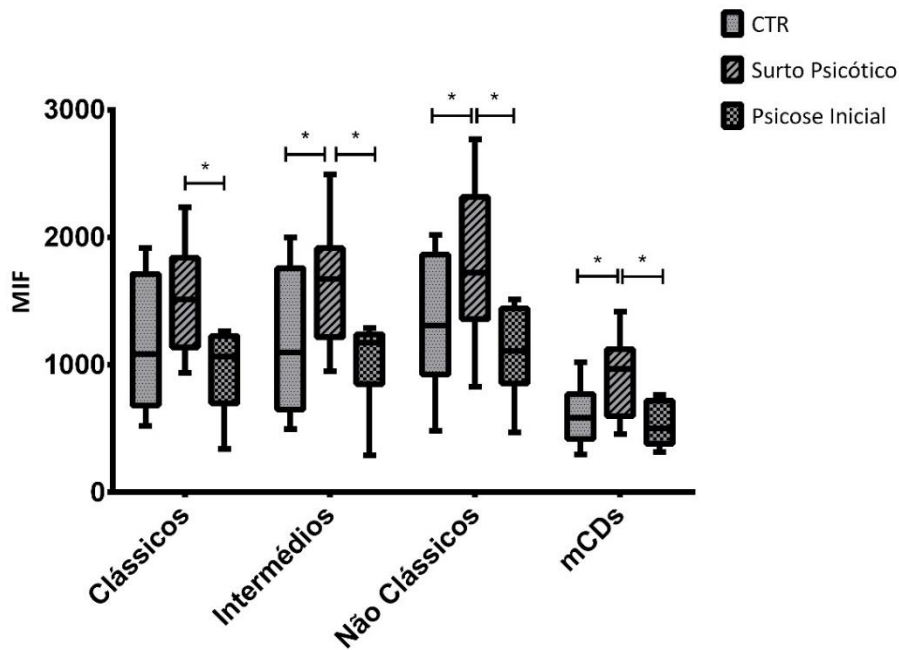
#### 6.4.1 Avaliação da frequência de células produtoras de IL-6 e a quantidade de citocina produzida

Verifica-se um aumento significativo na frequência de monócitos a produzir IL-6 nos monócitos não clássicos (**Figura 18**) nos doentes em surto psicótico. Também se parece verificar o aumento desta frequência nas células dendríticas mielóides, embora não seja estatisticamente significativo. De forma interessante essas frequências diminuem para valores próximos do grupo controlo quando os doentes se encontram fora do surto psicótico. Relativamente à quantidade de IL-6 por célula (dada pela média de intensidade de fluorescência), na **Figura 19**, verificou-se em todas as populações celulares estudadas um aumento estatisticamente significativo da MIF no grupo de doentes em surto, quer quando comparado com o grupo controlo quer com o grupo psicose inicial



**Figura 18** Frequência de produção de IL-6 pelas diferentes populações de monócitos, monócitos clássicos (A), monócitos intermédios (B), monócitos não clássicos (C), e células dendríticas mielóides (D), expressos em percentagem de células. As diferenças estatisticamente significativas  $p < 0.05$  são representadas por um \*.





**Figura 19** Média de Intensidade de Fluorescência (MIF) de IL-6 pelas diferentes populações de monócitos e células dendríticas mielóides. Os resultados estão expressos em intensidade média de fluorescência. As diferenças estatisticamente significativas  $p < 0.05$  são representadas por um \*.

No sentido de melhor documentar essa diminuição da frequência de células a produzir IL-6 e da quantidade desta citocina observada quando os doentes não se encontravam em surto psicótico, procedeu-se à comparação dos resultados só nos doentes que tinham realizado o estudo na altura do surto e fora deste (N=5). Na **Figura 20** verificou-se que em 4 dos 5 doentes ocorria uma diminuição da frequência de monócitos não clássicos a produzir IL-6 e uma diminuição da quantidade de IL-6 ao nível das células dendríticas mielóides nos 5 doentes estudados (**Figura 21**).

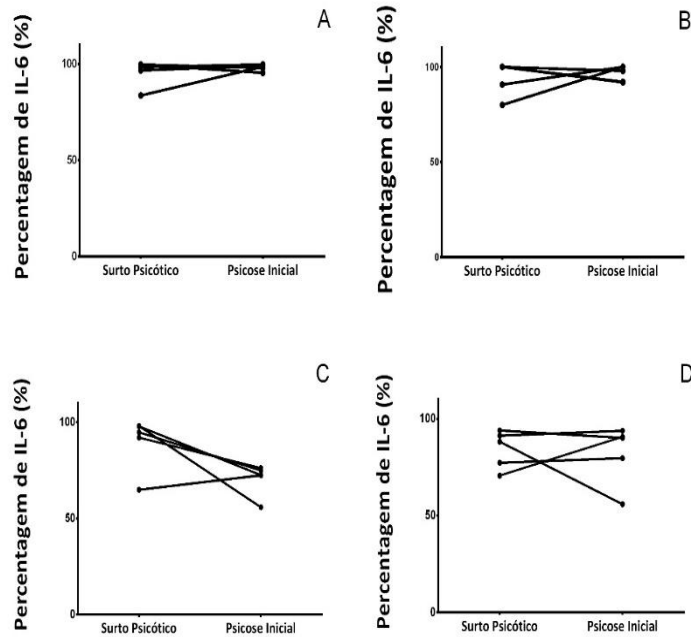


Figura 20 Frequência de produção de IL-6 pelas diferentes populações de monócitos, monócitos clássicos (A), monócitos intermédios (B), monócitos não clássicos (C), e células dendríticas mielóides (D), expressos em percentagem de células, nas amostras emparelhadas entre o grupo de doentes em surto e o grupo de doentes com psicose inicial. As diferenças estatisticamente significativas  $p < 0.05$  são representadas por um \*.

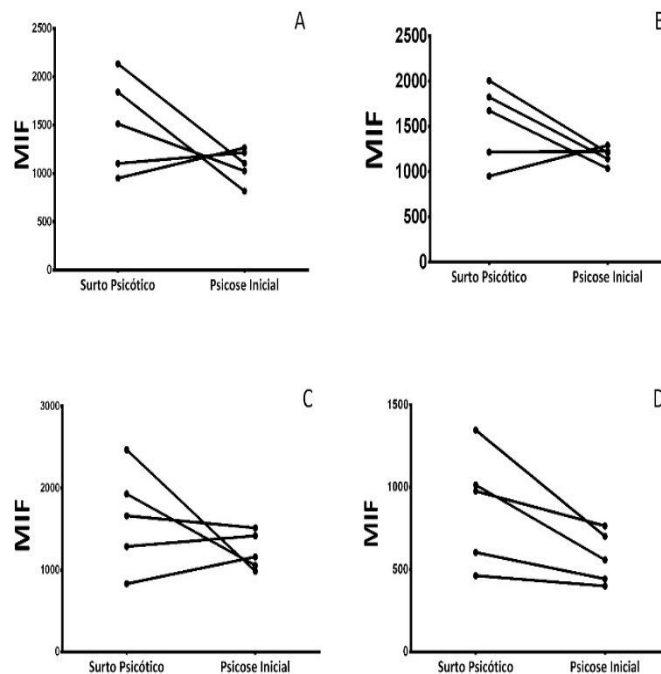
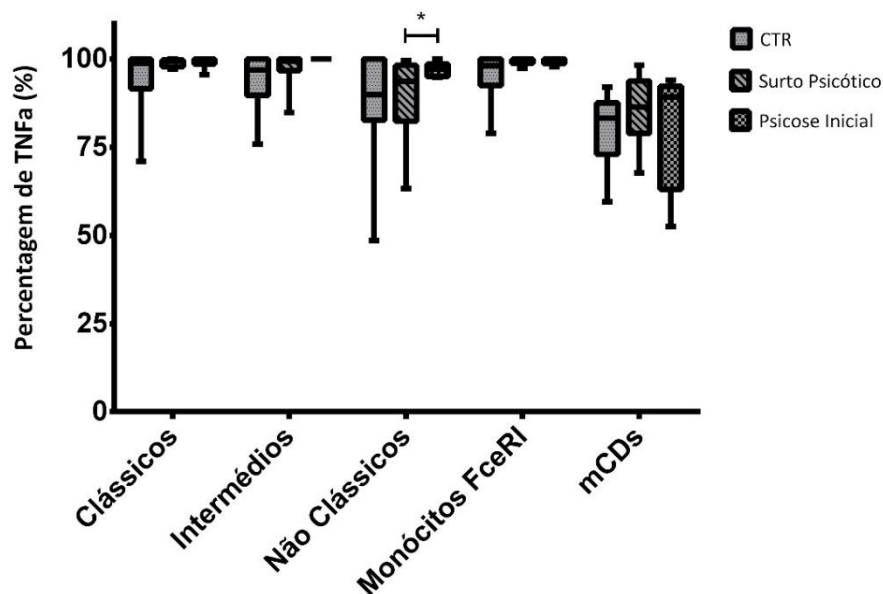


Figura 21 Média de Intensidade de Fluorescência (MIF) de IL-6 pelas diferentes populações de monócitos, monócitos clássicos (A), monócitos intermédios (B), monócitos não clássicos (C), e células dendríticas mielóides (D), expressos em percentagem de células, nas amostras emparelhadas entre o grupo de doentes em surto e o grupo de doentes com psicose inicial. As diferenças estatisticamente significativas  $p < 0.05$  são representadas por um \*.

#### 6.4.2 Quantificação da frequência de células produtoras de TNF- $\alpha$ e a quantidade de citocina produzida

Os resultados demonstraram, apenas, um aumento estatisticamente significativo da frequência de células produtoras de TNF- $\alpha$  nos monócitos não clássicos no grupo de doentes em psicose inicial quando comparado com os doentes em surto, embora pareça ocorrer uma tendência semelhante para as células dendríticas mielóides (**Figura 22**).



**Figura 22** Frequência de produção de TNF $\alpha$  pelas diferentes populações de monócitos e células dendríticas mielóides, expressos em percentagem de células. As diferenças estatisticamente significativas  $p < 0.05$  são representadas por um \*.

A quantidade de TNF- $\alpha$  por células está aumentada, no grupo de psicose inicial, em todas as subpopulações de monócitos, atingindo significado estatístico na população de monócitos não clássicos (**Figura 23**). Uma vez mais e no sentido de melhor documentar esse aumento da frequência de células a produzir TNF- $\alpha$  e da quantidade desta citocina observada quando os doentes não se encontravam em surto psicótico, procedeu-se à comparação dos resultados só nos doentes que tinham realizado o estudo na altura do surto e fora deste (N=6). De facto, observa-se um aumento da frequência de monócitos não clássicos e intermédios a produzir TNF- $\alpha$  quando os doentes se encontram fora do surto psicótico (**Figura 24**). Ao nível da quantidade de TNF- $\alpha$  por célula, observa-se uma tendência para o seu aumento em todas as subpopulações

de monócitos quanto os doentes estão fora do surto psicótico em 4 dos 6 doentes estudados (Figura 25).

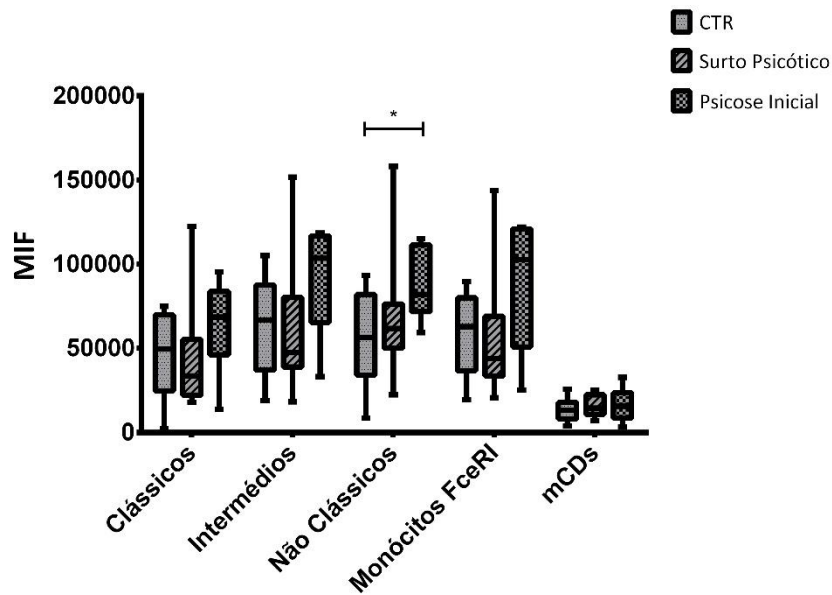


Figura 23 Média de Intensidade de Fluorescência (MIF) de TNF $\alpha$  pelas diferentes populações de monócitos e células dendríticas mielóides. Os resultados estão expressos em intensidade média de fluorescência. As diferenças estatisticamente significativas  $p < 0.05$  são representadas por um \*.

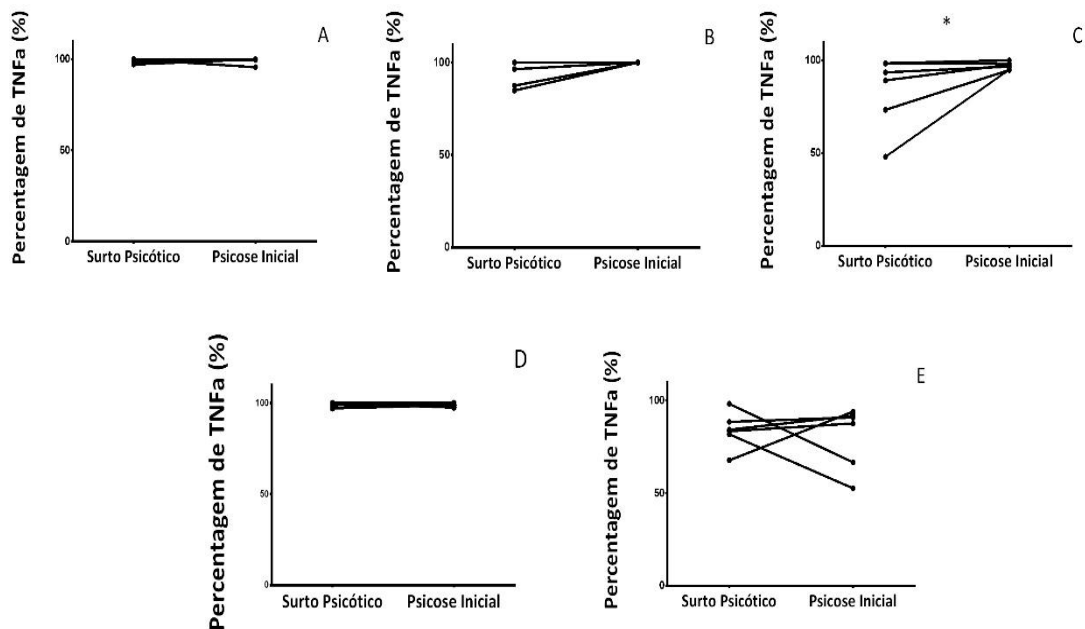
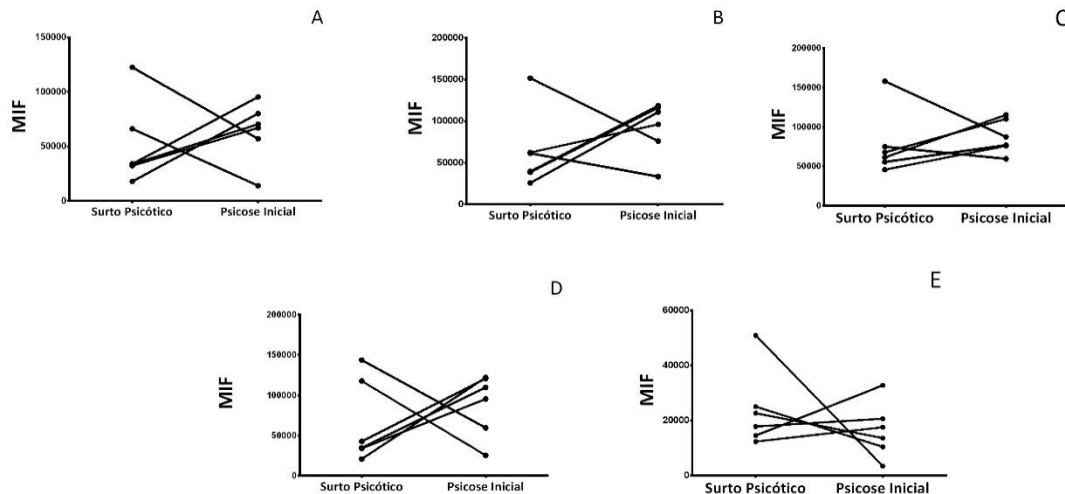


Figura 24 Frequência de produção de TNF $\alpha$  pelas diferentes populações de monócitos, monócitos clássicos (A), monócitos intermédios (B), monócitos não clássicos (C), monócitos que expressam Fc $\epsilon$ RI (D) e células dendríticas mielóides (E), expressos em percentagem de células, nas amostras emparelhadas entre o grupo de doentes em surto e o grupo de doentes com psicose inicial. As diferenças estatisticamente significativas  $p < 0.05$  são representadas por um \*.



**Figura 25** Média de Intensidade de Fluorescência (MIF) de TNF $\alpha$  pelas diferentes populações de monócitos, monócitos clássicos (A), monócitos intermédios (B), monócitos não clássicos (C), monócitos que expressam Fc $\epsilon$ RI (D) e células dendríticas mielóides (E), expressos em percentagem de células, nas amostras emparelhadas entre o grupo de doentes em surto e o grupo de doentes com psicose inicial. As diferenças estatisticamente significativas  $p < 0.05$  são representadas por um \*.

### 6.5 Expressão Génica de BDNF e CCL11 em monócitos e células dendríticas isolados por cell sorting

Na análise de expressão de CCL11 não se verificou nenhuma amplificação deste gene em qualquer um dos grupos em estudo. Contudo, verificaram-se 3 casos de amplificação do gene BDNF em surto psicótico, não se observando expressão deste gene nos grupos controlo e psicose inicial.

Tabela 7 Tabela de Expressão relativa do gene BDNF

BDNF	Percentagem de casos que expressam o gene
CTR	0% (0/10)
Surto Psicótico	23% (3/13)
Psicose Inicial	0 (0/6)

## *DISCUSSÃO*

## 7. Discussão

Contrariamente à tradicional forma de encarar o SNC como um órgão imunopreviligiado, protegido pelo sistema periférico, estudos nos últimos 20 anos notaram uma interacção complexa entre o sistema imune, inflamação sistémica e o cérebro, que conduzem a mudanças de humor, cognição e comportamento. A evidência de alterações no sistema imune periférico na SCZ parece clara, no entanto, os mecanismos envolvidos na interacção entre o SNC e a periferia mantêm-se por elucidar. Estudos anteriores associaram a doença a polimorfismos em genes com funções imunitárias importantes (47,48), a infecções pré-natais que aumentam o risco de desenvolvimento da doença (56,57) e a alterações das concentrações de citocinas quer ao nível do SNC, do CSF e na periferia, bem como alterações das células do sistema imune em circulação. Em resumo, existem diversas vias que poderão estar na origem da doença, onde não existe apenas uma causa etiológica que seja responsável por todos os casos, o que pode explicar, pelo menos em parte, a elevada heterogeneidade da doença.

A maioria dos estudos efectuados em SCZ incidem sobre os mecanismos patológicos ao nível do SNC, sendo inegável a importância da microglia, dos astrócitos e dos neurónios, nomeadamente pela produção de citocinas. Contudo, verificando-se o envolvimento do sistema periférico na fisiopatologia da doença, são necessários estudos ao nível das células do sistema imunitário, com maior incidência no sistema imunitário inato, como os monócitos, neutrófilos, macrófagos e células dendríticas já que são as células de primeira linha de defesa do organismo, aumentando o seu número de forma muito rápida bem como a sua capacidade de produção de citocinas.

Com o objectivo de clarificar quais as alterações que ocorrem nas diferentes populações de monócitos (clássicos, intermédios, não clássicos e que expressam o FcεRI), das células dendríticas mielóides e nas células dendríticas plasmacitóides do sangue periférico de doentes disgnosticados com SCZ, quer em surto quer em psicose inicial, procedeu-se à quantificação e análise fenotípica e funcional dessas células, de modo a verificar se essas populações se encontram alteradas, podendo desta forma constituírem um bom alvo de estudo para a monitorização da evolução da doença.

Parece ocorrer uma diminuição da percentagem de monócitos não clássicos e um aumento de monócitos com IgE ligada ao seu receptor de alta afinidade nos grupos de esquizofrenia. Ocorre, também, um aumento da frequência de células dendríticas plasmacitóides no grupo de psicose inicial. Relativamente aos valores absolutos ocorre um aumento dos monócitos clássicos em surto psicótico. O aumento dos monócitos em SCZ já foi descrito em alguns estudos embora não tenha sido efectuado o estudo ao nível das diferentes

populações de monócitos (9,10). Na doença de Parkinson, os monócitos encontram-se permanentemente activados, produzindo citocinas que contribuem para a inflamação verificada na doença, sendo que, mesmo após estimulação, os mesmos respondem, tornando-se hiperactivados, contribuindo para uma maior severidade da doença (85). Na doença de Alzheimer, ocorre um estado de inflamação intenso, levando também a um aumento de citocinas quer no SNC quer a nível periférico, verificando-se um aumento da população de monócitos no sangue periférico, em doentes, quando comparados com controlos, bem como da frequência destas células a produzir citocinas, tais como, IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-12 e TNF- $\alpha$ , reforçando a existência de um estado de inflamação crónica na doença (86).

A expressão de HLA-DR nos monócitos e nas células dendríticas tem como principal função nos monócitos auxiliá-los na apresentação de antígenos aos linfócitos T, desencadeando respostas inflamatórias. Observou-se um aumento da expressão desta molécula nos monócitos intermédios e não clássicos no grupo de doentes com psicose inicial, comprovada quando se comparou os doentes que foram avaliados em surto e fora dele. Os monócitos intermédios são células que expressam elevados níveis de MHC classe II e produzem grandes quantidades de citocinas, nomeadamente o TNF- $\alpha$ . Sabe-se que a modulação da expressão de HLA-DR não é igual para as diferentes populações de monócitos aquando de uma inflamação sistémica. De facto, em casos de *stress* (trauma, cirurgias, hemorragias, outros) este receptor encontra-se diminuído em monócitos clássicos, não sendo essa diminuição tão acentuada nos monócitos não clássicos (93). Não existem estudos que mostrem a variação da expressão deste receptor em doenças psiquiátricas, no entanto, há evidências do aumento da expressão de HLA-DR em células da microglia no SNC, em doentes esquizofrénicos crónicos sob influência de tratamento (94). Desta forma, sugere-se que poderá haver uma relação idêntica entre os monócitos intermédios e não clássicos na expressão de HLA-DR em doentes na fase pós-surto, sob tratamento (grupo de psicose inicial).

As citocinas são produzidas por vários tipos de células com o objectivo de regular a proliferação e a diferenciação celular. Tanto a IL-6 como o TNF- $\alpha$  estão elevados em várias, se não em todas, as patologias onde ocorrem estados inflamatórios, havendo na actualidade terapêuticas com base em anticorpos monoclonais que regulam a atividade destas citocinas. Neste trabalho, estudámos a frequência das diferentes subpopulações de monócitos e células dendríticas mielóides produtoras de IL-6 e de TNF- $\alpha$ , bem como a quantidade de citocinas produzida por célula, após activação com LPS e IFN- $\gamma$ , a fim de entender qual a sua envolvimento no estado inflamatório descrito na doença de esquizofrenia.

A IL-6 é maioritariamente reconhecida pela sua função pró-inflamatória ao estimular o sistema imunitário, no entanto, também é descrita como uma citocina anti-inflamatória ou



regenerativa. Os resultados evidenciaram um aumento significativo da frequência de monócitos não clássicos produtores de IL-6 nos doentes em surto psicótico, bem como um aumento da produção da citocina por célula na maioria das populações celulares estudadas. Por sua vez, na ausência de surto esses valores são similares aos observados no grupo controle. Estudos demonstram que na ocorrência de um primeiro episódio de surto os doentes encontram-se num estado pró-inflamatório, tendo sido descrito uma elevada concentração de IL-6 ao nível do plasma (95), não se verificando as mesmas alterações durante os períodos clínicos de estabilidade do doente (96,97). No entanto, estes resultados não são concordantes em todos os estudos, havendo alguns que reportam um aumento desta citocina na fase crónica da doença (98,99). O aumento dos níveis plasmáticos de IL-6, quer em surto quer em fase crónica, não explicam a sua origem, podendo ser produzida por várias células (100). Com intuito de compreender a origem dos elevados níveis desta citocina em doentes com esquizofrenia, Kayla, A. et al (2016) (101) verificou que nos casos em que a IL-6 estava aumentada, os níveis de expressão de mRNA nas células mononucleares do sangue periférico encontravam-se também aumentados nos doentes com esquizofrenia, sugerindo que estas poderão ser umas das principais fontes de IL-6 na doença, o que vai na mesma linha dos resultados observados nesta tese. Estes resultados sugerem que a frequência de células produtoras de IL-6 e a quantidade desta citocina por célula, poderão constituir-se bons biomarcadores periféricos para a detecção precoce de um episódio de surto da doença.

O TNF- $\alpha$  tornou-se a citocina mais estudada na inflamação crónica, como as doenças autoimunes, e nas infecções bacterianas e virais. Nos resultados obtidos observámos um aumento significativo da frequência de TNF- $\alpha$  em psicose inicial apenas nos monócitos não clássicos, quando comparado com o surto psicótico. Já na quantidade de TNF- $\alpha$  por célula verificou-se um aumento em todas as subpopulações de monócitos, também em psicose inicial, atingindo significado estatístico nos monócitos não clássicos. Contrariamente ao que ocorre com a IL-6, que está aumentada nos doentes em surto, o TNF- $\alpha$  parece ter um aumento nos doentes em psicose inicial, os quais já se encontram sob efeito de antipsicóticos. Estudos anteriores revelam a existência de muita controvérsia na variação dos níveis de TNF- $\alpha$  em doentes de surto e doentes em fase crónica, em alguns estudos verificou-se uma diminuição (102), outros um aumento (103), e há casos onde os níveis se mantêm inalterados (104-107). Muitas destas discrepâncias devem-se também ao tipo de material usado na investigação deste marcador, estudos utilizam amostra de CSF, outros de plasma e outros de sangue. Contudo, é comum para os vários estudos que na fase aguda da doença, em surto, ocorre um aumento no plasma dos níveis de TNF- $\alpha$  (96), mantendo-se estáveis mesmo já em fase de tratamento. Muitos destes estudos utilizam doentes em fase crónica, com mais de vinte anos de tratamento, verificando

estes níveis sob efeito de tratamento a longo prazo. Os nossos resultados demonstram um aumento da TNF- $\alpha$  fora do surto, e em psicose inicial, num estado de early stage sob efeito de antipsicóticos de meses, e não de anos.

De forma interessante, quando se avaliaram os doentes nos quais tínhamos realizado o estudo na altura do surto e fora deste, verificámos que em dois dos seis doentes não se observou o aumento da quantidade de TNF- $\alpha$  por célula, mas sim uma diminuição. Ao avaliar os dados clínicos destes dois doentes verificou-se que ambos estão sob tratamento do antipsicótico Paliperidona, e que mais nenhum dos restantes se encontrava sob este tratamento, pelo que poderia ser interessante estudar dois grupos com psicose inicial com diferentes protocolos terapêuticos. Não existem ainda estudos que demonstrem a relação existente entre a paliperidona no efeito anti-inflamatório em doentes com esquizofrenia, nomeadamente ao nível da produção de citocinas. Contudo, um estudo demonstrou que a paliperidona previne a activação via Toll Like receptor 4 nas células da glia reduzindo, assim a produção de TNF- $\alpha$  no SNC, em ratinhos (108). Por sua vez, tanto para o antipsicótico clozapina (mais utilizado no tratamento de doentes com esquizofrenia) como para o haloperidol existem evidências da sua actividade imunossupressora (109). A frequência de células produtoras de TNF- $\alpha$ , bem como a quantidade desta citocina por célula, e contrariamente ao observado para a IL-6, não serão bons biomarcadores de ocorrência de surto psicótico, mas poderão vir a revelar-se de interesse na monitorização da inflamação crónica fora do surto psicótico.

Relativamente aos resultados da expressão de IgE ligada ao seu receptor, observou-se um aumento da mesma nos monócitos que expressam o Fc $\epsilon$ RI, nas células dendríticas mielóides e nas células dendríticas plasmacitóides em ambos os grupos de SCZ. De facto, existem vários estudos que demonstram um aumento da IgE sérica em esquizofrenia (114), explicando a observação de um aumento da IgE ligada aos receptores de alta afinidade dos monócitos e células dendríticas nos nossos resultados.

A forma como o IgE se liga ao receptor de Fc $\epsilon$ RI na membrana das CDs e nas outras APC's, como os monócitos, está associada a diferentes mecanismos activados por este receptor. Quando as DCs apresentam o antígeno processado às células T-naive, dá-se a activação de vias de sinalização pró-inflamatórias ou anti-inflamatórias (dependendo do microambiente de citocinas, dos tecidos onde residem e das células vizinhas), que culminam em ambos os casos na activação das células TCD4+ efectoras específicas para o antígeno, que podem ser do tipo Th2 tal como Sharquie et al. demonstraram no estudo (127). Um dos mecanismos que ocorre quando existe uma ligação cruzada do IgE ligado ao antígeno com o seu receptor Fc $\epsilon$ RI nas DCs, é a internalização do complexo IgE-antígeno-Fc $\epsilon$ RI para lisossomas intracelulares, onde os antígenos são processados e expostos, sendo depois apresentados através de moléculas do

MHC II às células TCD4 + *naive*, culminando no desenvolvimento de células Th2 efectoras. Quando ocorre a formação do complexo FcεRI-IgE com o antígeno ligado à IgE ocorre a internalização e digestão da mesma forma, apresentando-o através de moléculas do MHC II a células TCD4 + específicas para o antígeno, que após o seu reconhecimento entram em apoptose, resultando no desenvolvimento de tolerância imunitária (128). Por sua vez, quando não existe um antígeno associado à IgE em circulação que se liga ao seu receptor FcεRI nas APC's, estas desempenham a tarefa de remoção desta IgE extracelular através da incorporação do complexo FcεRI-IgE internalizado em vesículas lisossomais, promovendo a sua degradação intracelular.

A população de monócitos que expressa FcεRI consiste em menos de 5% da população total de monócitos, acreditando-se que esta subpopulação pode diferenciar-se em DCs, adquirindo rapidamente características das mesmas, supondo assim que os mecanismos desencadeados pela ligação do IgE ao receptor FcεRI na presença de antígeno são idênticos. Adicionalmente, segundo o estudo de Pyle et al, no caso particular de monócitos que expressam FcεRI, a presença de elevadas concentrações séricas de IgE parece influenciar negativamente a função fagocítica destas células (129). Sabendo que os macrófagos, derivados de monócitos no SNC, são responsáveis pela resolução da neuroinflamação através da fagocitose de componentes celulares mortos, a redução da sua capacidade fagocítica pode tornar-se problemática, podendo contribuir para a fisiopatologia da doença. Além disso, as concentrações séricas de IgE induzem nos monócitos um processo pró-inflamatório mediado através da expressão de citocinas inflamatórias, tais com a IL-6 e TNF-α. Os nossos resultados sugerem que a ligação de IgE ao seu receptor de alta afinidade nos monócitos e nas células dendríticas pode promover o aumento da inflamação periférica através da produção de diversos mediadores inflamatórios.

O aumento de IgE encontra-se normalmente associado a uma resposta Th2 por parte das células T. De facto, existem estudos que associam a esquizofrenia a uma extensa actividade das células Th2 (113), ocorrendo o aumento destes linfócitos no sangue e o consequente aumento da produção de IgE (114). O desvio da resposta inflamatória para Th2 foi descrito em doentes com esquizofrenia, verificando-se um aumento das citocinas capazes de activar estas células, como a IL-6, principalmente em doentes que não respondem ao tratamento (115). A diminuição da resposta imune induzida por células Th1 foi descrita em esquizofrenia, com diminuição dos níveis das citocinas IL-2 e IFN-γ, o que poderá indicar o aumento da resposta imunitária mediada pelas Th2 observada em surto (116). Desta forma seria interessante quantificar o nível de citocinas no plasma produzidas pelas células Th2, como por exemplo a IL-4 e IL-13.

Relativamente à expressão génica de BDNF e CCL11, apenas se verificaram amplificações de BDNF em monócitos em três doentes no grupo de surto psicótico. O BDNF é uma neurotrofina com um papel preponderante no desenvolvimento, regeneração, sobrevivência e manutenção dos neurónios no SNC (117), sendo o factor neurotrófico mais produzido no cérebro (118). Estudos referem que existe uma relação entre o BDNF e a esquizofrenia, podendo estar envolvido na fisiopatologia da doença. Tanto em doentes que ainda não iniciaram o tratamento (119), como após o início do tratamento (120), verifica-se uma redução dos níveis de BDNF. Contudo, esta neurotrofina não é apenas produzida no cérebro, mas também ao nível das células da periferia, como as células endoteliais, imunitárias, fibroblastos, entre outras, como efeito neuroprotector em resposta a sinais inflamatórios, de forma proporcional aos níveis no SNC (121).

Têm sido descritos baixos níveis de BDNF no sangue periférico em SCZ, o que de alguma maneira pode explicar, pelo menos em parte, a ausência de expressão deste gene na maioria dos doentes e em todos os controlos. No entanto, verificámos que os monócitos e as células dendríticas mielóides parecem estar mais activados em SCZ (aumento de células produtoras de citocinas e quantidade de citocina por célula), pelo que se poderia esperar maiores níveis de detecção na expressão génica de BDNF. Uma possível explicação pode ser devido à grande parte dessas diferenças entre SCZ e o grupo controlo não terem sido observadas nos monócitos clássicos, representando estes, a grande maioria das células em estudo. Sendo assim, teria sido mais interessante separar todas as populações estudadas para estudo de expressão génica e não a globalidade de monócitos em conjunto com as células dendríticas mielóides.

Também, a produção de BDNF ao nível periférico é inversamente proporcional aos níveis de IL-6 e TNF- $\alpha$  (122), o que pode ajudar a explicar a ausência de expressão nestes doentes, uma vez que estas citocinas, IL-6 e o TNF- $\alpha$  se encontram aumentadas em SCZ.

A CCL11 ou eotaxina é uma quimiocina que se liga ao receptor CCR3 expresso em eosinófilos, mastócitos e células Th2 (122). Estudos indicam que ocorre um aumento dos níveis de CCL11 no plasma em esquizofrenia (123), que pode ativar as células Th2, que por consequência pode induzir um aumento de produção de IgE. Contudo, não se verificou amplificação deste gene para nenhum dos grupos em estudo, apesar de estar descrito na literatura que os monócitos produzem CCL11. Mais estudos deverão ser efectuados a fim de compreender que células são responsáveis pela sua produção em esquizofrenia, se essa quimiocina se encontra aumentada no plasma e a sua possível relação com o aumento de IgE verificado em SCZ.

Existem algumas limitações neste estudo que podem influenciar a validação dos resultados, nomeadamente a sua significância estatística. A pequena dimensão da amostra não

garante a representação de toda a população de doentes em surto e em psicose inicial, não tendo sido selecionada de forma aleatória. Cerca de 70% dos doentes que iniciam um tratamento/seguimento de consultas após um primeiro surto, não regressam para uma próxima consulta, condicionando também o seu acompanhamento neste tipo de estudos explicando a redução do número de casos entre o surto psicótico (N=17) e a psicose inicial (N=6). Outra limitação passa pelo facto de terem sido apenas estudadas duas citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$  e IL-6) e de não terem sido estudadas citocinas anti-inflamatórias, tal como a IL-10, que pudessem demonstrar a capacidade anti-inflamatória destes indivíduos antes e depois do início do tratamento. Também o estudo de genes pró-inflamatórios e anti-inflamatórios em monócitos do sangue periférico e em monócitos activados das diferentes populações poderia ajudar a esclarecer algumas evidências verificadas. Ao nível do plasma, a observação dos níveis de algumas citocinas/quimiocinas que possam relacionar os nossos resultados com uma via de sinalização, promovendo a integração da informação, e esclarecer alguns mecanismos por onde poderá estar envolvida a fisiopatologia da doença.

## *CONCLUSÃO*

## 8. Conclusão

Durante o surto psicótico observou-se um aumento da frequência de monócitos não clássicos produtores de IL-6, mas principalmente, um aumento da quantidade desta citocina por célula, em todas as subpopulações de monócitos e nas células dendríticas mielóides. De forma interessante, estas alterações desaparecem no grupo de doentes fora de surto, sugerindo que estas células poderão ser responsáveis pela produção de citocinas pró-inflamatórias e pelo estado de inflamação aguda que se verifica nesta fase da doença, podendo constituir-se como bons biomarcadores de monitorização/prevenção de um surto psicótico

Pelo contrário, observou-se um aumento da frequência de monócitos não clássicos produtores de TNF- $\alpha$ , bem como da quantidade desta citocina ao nível destas células em doentes fora de surto, que associado ao aumento da expressão de HLA-DR, pode traduzir que estas células se encontrem activadas nesta fase da doença, assumindo um perfil de produção de citocinas pro-inflamatórias diferente do observado em surto ( $\downarrow$ TNF- $\alpha$ /IL-6 $\uparrow$  versus  $\uparrow$ TNF $\alpha$ /IL-6 $\downarrow$ ).

Um outro achado relevante deste estudo foi o aumento da expressão da IgE ligado ao seu receptor de alta afinidade, traduzindo o aumento de IgE sérica nestes doentes, quer em surto quer fora dele, podendo estar associado ao fenótipo de activação observado nas células dendríticas mielóides nos doentes em surto.

A pesquisa de respostas para as doenças psiquiátricas, como a SCZ, entra numa era de imunopsiquiatria que mudará o modo como olhamos para as doenças mentais nas quais as manifestações clínicas não se restringem apenas a sintomas mentais, mas também a alterações ao nível celular e molecular na periferia. De uma forma global estes resultados, demonstram que ocorrem alterações fenotípicas e funcionais nos monócitos e células dendríticas na doença, salientando-se claramente os monócitos não clássicos, pelo que um estudo mais aprofundado destas células poderia ser um bom ponto de partida para uma melhor compreensão da esquizofrenia, constituindo bons biomarcadores de prevenção, diagnóstico e monitorização.

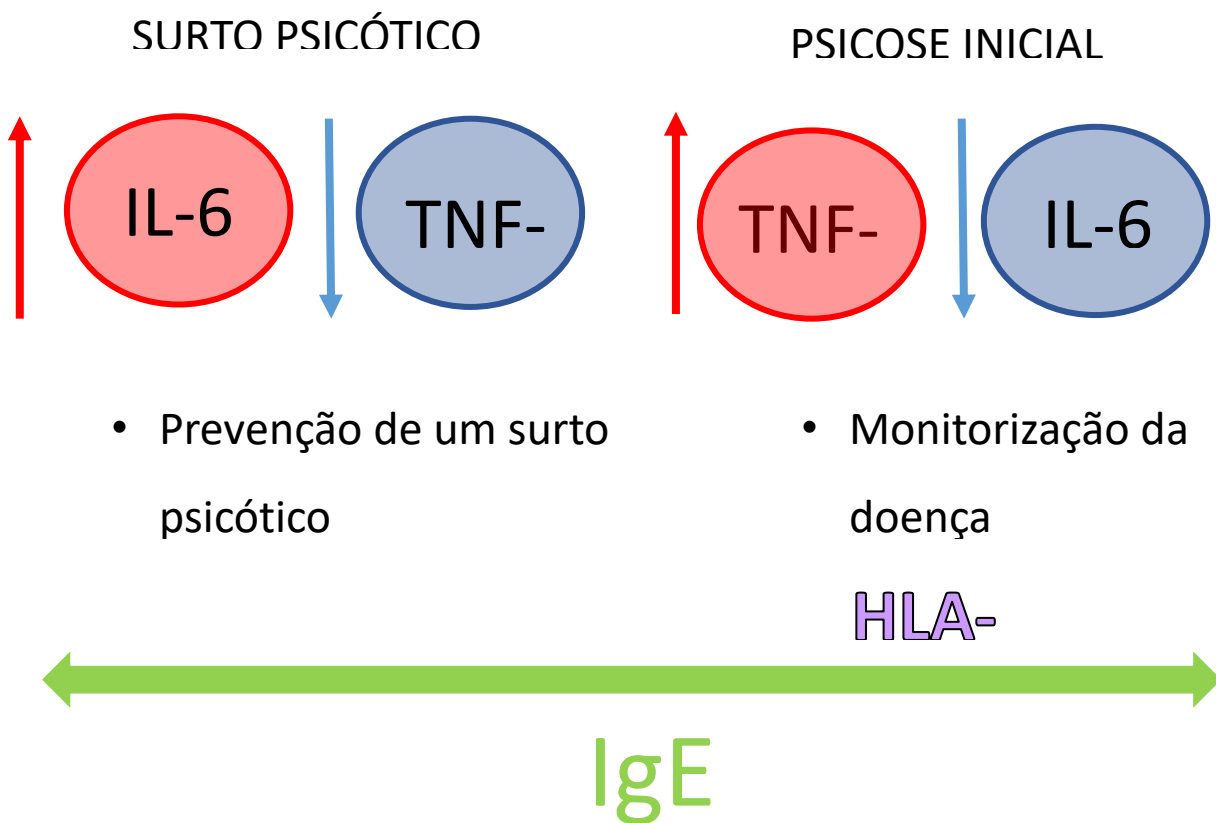


Figura 26 Esquema que resume as principais conclusões do estudo realizado.



## 9. Bibliografia

1. van Berckel BN, Bossong MG, Boellaard R, Kloet R, Schuitmaker A, Caspers E, et al. Microglia activation in recent-onset schizophrenia: a quantitative (R)-[11C]PK11195 positron emission tomography study. *Biol Psychiatry* [Internet]. 2008 Nov 1 [cited 2017 Jan 12];64(9):820–2. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006322308005039>
2. TANDON R, KESHAVAN M, NASRALLAH H. Schizophrenia, “Just the Facts” What we know in 2008. 2. Epidemiology and etiology. *Schizophr Res* [Internet]. 2008 Jul [cited 2017 Jan 12];102(1–3):1–18. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18514488>
3. de Bie J, Lim CK, Guillemin GJ. Kynurenines, Gender and Neuroinflammation; Showcase Schizophrenia. *Neurotox Res*. 2016;30(3):285–94.
4. Rössler W, Ajdacic-Gross V, Müller M, Rodgers S, Kawohl W, Haker H, et al. Association between processing speed and subclinical psychotic symptoms in the general population: Focusing on sex differences. *Schizophr Res* [Internet]. 2015 Aug [cited 2017 Jan 12];166(1–3):316–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26070411>
5. Schmitt A, Malchow B, Hasan A, Falkai P. The impact of environmental factors in severe psychiatric disorders. *Front Neurosci* [Internet]. 2014 [cited 2017 Jan 12];8:19. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnins.2014.00019/abstract>
6. Shi J, Levinson DF, Duan J, Sanders AR, Zheng Y, Pe’er I, et al. Common variants on chromosome 6p22.1 are associated with schizophrenia. *Nature* [Internet]. 2009 Jul 1 [cited 2017 Feb 2]; Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature08192>
7. Hernandez A, Burton AC, O’Donnell P, Schoenbaum G, Roesch MR. Altered basolateral amygdala encoding in an animal model of schizophrenia. *J Neurosci* [Internet]. 2015 Apr 22 [cited 2017 Jan 12];35(16):6394–400. Available from: <http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.5096-14.2015>
8. Koleske AJ. Molecular mechanisms of dendrite stability. *Nat Rev Neurosci* [Internet]. 2013 Aug 10 [cited 2017 Jan 12];14(8):536–50. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrn3486>
9. Fiala JC, Spacek J, Harris KM. Dendritic spine pathology: cause or consequence of neurological disorders? *Brain Res Brain Res Rev* [Internet]. 2002 Jun [cited 2017 Jan 12];39(1):29–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12086707>
10. Schnack HG, Ph D, Bertens MGBC, Haren NEM Van, Tweel I Van Der, Staal WG, et al. Volume Changes in Gray Matter in Patients With Schizophrenia. 2002;C(February):244–50.
11. Rao J, Chiappelli J, Kochunov P, Regenold WT, Rapoport SI, Hong LE. Is Schizophrenia a

- Neurodegenerative Disease? Evidence from Age-Related Decline of Brain-Derived Neurotrophic Factor in the Brains of Schizophrenia Patients and Matched Nonpsychiatric Controls. *Neurodegener Dis* [Internet]. 2014 Dec 17 [cited 2017 Jan 12];15(1):38–44. Available from: <http://www.karger.com/?doi=10.1159/000369214>
12. Nikonenko I, Nikonenko A, Mendez P, Michurina T V, Enikolopov G, Muller D. Nitric oxide mediates local activity-dependent excitatory synapse development. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2013 Oct 29 [cited 2017 Jan 12];110(44):E4142-51. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1311927110>
  13. Kapur S, Mamo D. Half a century of antipsychotics and still a central role for dopamine D2 receptors. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* [Internet]. 2003 Oct [cited 2017 Jan 13];27(7):1081–90. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278584603002173>
  14. Floresco SB. The Nucleus Accumbens: An Interface Between Cognition, Emotion, and Action. *Annu Rev Psychol* [Internet]. 2015 Jan 3 [cited 2017 Jan 13];66(1):25–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25251489>
  15. Arnsten AFT, Wang MJ, Paspalas CD. Neuromodulation of thought: flexibilities and vulnerabilities in prefrontal cortical network synapses. *Neuron* [Internet]. 2012 Oct 4 [cited 2017 Jan 13];76(1):223–39. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896627312008045>
  16. Kolb B, Gibb R. Plasticity in the prefrontal cortex of adult rats. *Front Cell Neurosci* [Internet]. 2015 Feb 3 [cited 2017 Jan 13];9:15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25691857>
  17. Cepeda C, André VM, Jocoy EL, Levine MS. NMDA and Dopamine: Diverse Mechanisms Applied to Interacting Receptor Systems [Internet]. *Biology of the NMDA Receptor*. 2009 [cited 2017 Jan 13]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21204414>
  18. Pomarol-Clotet E, Honey GD, Murray GK, Corlett PR, Absalom AR, Lee M, et al. Psychological effects of ketamine in healthy volunteers. Phenomenological study. *Br J Psychiatry* [Internet]. 2006 Aug 1 [cited 2017 Jan 13];189(2):173–9. Available from: <http://bjp.rcpsych.org/cgi/doi/10.1192/bjp.bp.105.015263>
  19. Steiner J, Walter M, Glanz W, Sarnyai Z, Bernstein H-G, Vielhaber S, et al. Increased Prevalence of Diverse N -Methyl-D-Aspartate Glutamate Receptor Antibodies in Patients With an Initial Diagnosis of Schizophrenia. *JAMA Psychiatry* [Internet]. 2013 Mar 1 [cited 2017 Jan 13];70(3):271. Available from: <http://archpsyc.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/2013.jamapsychiatry.86>

20. Zandi MS, Irani SR, Lang B, Waters P, Jones PB, McKenna P, et al. Disease-relevant autoantibodies in first episode schizophrenia. *J Neurol* [Internet]. 2011 Apr 26 [cited 2017 Jan 13];258(4):686–8. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00415-010-5788-9>
21. Parthasarathi UD, Harrower T, Tempest M, Hodges JR, Walsh C, McKenna PJ, et al. Psychiatric presentation of voltage-gated potassium channel antibody-associated encephalopathy. Case report. *Br J Psychiatry* [Internet]. 2006 Aug 1 [cited 2017 Jan 13];189(2):182–3. Available from: <http://bjp.rcpsych.org/cgi/doi/10.1192/bjp.bp.105.012864>
22. Zandi MS, Deakin JB, Morris K, Buckley C, Jacobson L, Scoriels L, et al. Immunotherapy for patients with acute psychosis and serum N-Methyl D-Aspartate receptor (NMDAR) antibodies: a description of a treated case series. *Schizophr Res* [Internet]. 2014 Dec [cited 2017 Jan 13];160(1–3):193–5. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0920996414006355>
23. Ichikawa J, Ishii H, Bonaccorso S, Fowler WL, O’Laughlin IA, Meltzer HY. 5-HT(2A) and D(2) receptor blockade increases cortical DA release via 5-HT(1A) receptor activation: a possible mechanism of atypical antipsychotic-induced cortical dopamine release. *J Neurochem* [Internet]. 2001 Mar [cited 2017 Jan 13];76(5):1521–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11238736>
24. Ormstad H, Verkerk R, Aass HCD, Amthor K-F, Sandvik L. Inflammation-induced catabolism of tryptophan and tyrosine in acute ischemic stroke. *J Mol Neurosci* [Internet]. 2013 Nov 30 [cited 2017 Jan 13];51(3):893–902. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s12031-013-0097-2>
25. Grant RS, Coggan SE, Smythe GA. The physiological action of picolinic Acid in the human brain. *Int J Tryptophan Res* [Internet]. 2009 [cited 2017 Jan 13];2:71–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22084583>
26. Guillemin GJ, Smythe G, Takikawa O, Brew BJ. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase and production of quinolinic acid by human microglia, astrocytes, and neurons. *Glia* [Internet]. 2005 Jan 1 [cited 2017 Jan 13];49(1):15–23. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/glia.20090>
27. Guillemin GJ, Kerr SJ, Smythe GA, Smith DG, Kapoor V, Armati PJ, et al. Kynurenine pathway metabolism in human astrocytes: a paradox for neuronal protection. *J Neurochem* [Internet]. 2001 Aug [cited 2017 Jan 13];78(4):842–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11520905>
28. Schwarcz R, Rassoulpour A, Wu HQ, Medoff D, Tamminga CA, Roberts RC. Increased cortical kynurenate content in schizophrenia. *Biol Psychiatry* [Internet]. 2001 Oct 1 [cited 2017 Jan 13];50(7):521–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11600105>

29. Trépanier MO, Hopperton KE, Mizrahi R, Mechawar N, Bazinet RP. Postmortem evidence of cerebral inflammation in schizophrenia: a systematic review. *Mol Psychiatry* [Internet]. 2016;(April):1009–26. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/mp.2016.90>
30. Chaudhry IB, Hallak J, Husain N, Minhas F, Stirling J, Richardson P, et al. Minocycline benefits negative symptoms in early schizophrenia: a randomised double-blind placebo-controlled clinical trial in patients on standard treatment. *J Psychopharmacol* [Internet]. 2012 Sep 1 [cited 2017 Jan 13];26(9):1185–93. Available from: <http://jop.sagepub.com/cgi/doi/10.1177/0269881112444941>
31. Cherry JD, Olschowka JA, O'Banion MK. Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed. *J Neuroinflammation* [Internet]. 2014 Jun 3 [cited 2017 Jan 13];11(1):98. Available from: <http://jneuroinflammation.biomedcentral.com/articles/10.1186/1742-2094-11-98>
32. Monji A, Kato T, Kanba S. Cytokines and schizophrenia: Microglia hypothesis of schizophrenia. *Psychiatry Clin Neurosci* [Internet]. 2009 Jun [cited 2017 Jan 13];63(3):257–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19579286>
33. Doorduyn J, de Vries EFJ, Willemsen ATM, de Groot JC, Dierckx RA, Klein HC. Neuroinflammation in schizophrenia-related psychosis: a PET study. *J Nucl Med* [Internet]. 2009 Nov 1 [cited 2017 Jan 13];50(11):1801–7. Available from: <http://jnm.snmjournals.org/cgi/doi/10.2967/jnumed.109.066647>
34. van Neerven S, Nemes A, Imholz P, Regen T, Denecke B, Johann S, et al. Inflammatory cytokine release of astrocytes in vitro is reduced by all-trans retinoic acid. *J Neuroimmunol* [Internet]. 2010 Dec 15 [cited 2017 Jan 13];229(1–2):169–79. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20826012>
35. Heneka MT, Carson MJ, Khoury J El, Landreth GE, Brosseron F, Feinstein DL, et al. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* [Internet]. 2015 Apr [cited 2017 Jan 13];14(4):388–405. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25792098>
36. Potvin S, Stip E, Sepehry AA, Gendron A, Bah R, Kouassi E. Inflammatory cytokine alterations in schizophrenia: a systematic quantitative review. *Biol Psychiatry* [Internet]. 2008 Apr 15 [cited 2017 Jan 13];63(8):801–8. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006322307009481>
37. Miller BJ, Buckley P, Seabolt W, Mellor A, Kirkpatrick B. Meta-Analysis of Cytokine Alterations in Schizophrenia: Clinical Status and Antipsychotic Effects. *Biol Psychiatry* [Internet]. 2011 Oct 1 [cited 2017 Jan 13];70(7):663–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21641581>

38. Akhondzadeh S, Tabatabaee M, Amini H, Ahmadi Abhari SA, Abbasi SH, Behnam B. Celecoxib as adjunctive therapy in schizophrenia: a double-blind, randomized and placebo-controlled trial. *Schizophr Res* [Internet]. 2007 Feb [cited 2017 Jan 13];90(1–3):179–85. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0920996406004956>
39. Laan W, Grobbee DE, Selten J-P, Heijnen CJ, Kahn RS, Burger H. Adjuvant aspirin therapy reduces symptoms of schizophrenia spectrum disorders: results from a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Clin Psychiatry* [Internet]. 2010 May 15 [cited 2017 Jan 13];71(5):520–7. Available from: <http://article.psychiatrist.com/?ContentType=START&ID=10006874>
40. Müller N, Riedel M, Scheppach C, Brandstätter B, Sokullu S, Krampe K, et al. Beneficial Antipsychotic Effects of Celecoxib Add-On Therapy Compared to Risperidone Alone in Schizophrenia. *Am J Psychiatry* [Internet]. 2002 Jun [cited 2017 Jan 13];159(6):1029–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12042193>
41. Watkins CC, Andrews SR. Clinical studies of neuroinflammatory mechanisms in schizophrenia. *Schizophr Res*. 2016;176(1):14–22.
42. Denes A, Thornton P, Rothwell NJ, Allan SM. Inflammation and brain injury: Acute cerebral ischaemia, peripheral and central inflammation. *Brain Behav Immun* [Internet]. 2010 Jul [cited 2017 Jan 13];24(5):708–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19770034>
43. Torrey EF, Miller J, Rawlings R, Yolken RH. Seasonality of births in schizophrenia and bipolar disorder: a review of the literature. *Schizophr Res* [Internet]. 1997 Nov 7 [cited 2017 Jan 13];28(1):1–38. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9428062>
44. Lampron A, Elali A, Rivest S. Innate immunity in the CNS: redefining the relationship between the CNS and Its environment. *Neuron* [Internet]. 2013 Apr 24 [cited 2017 Jan 13];78(2):214–32. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896627313002833>
45. Capuron L, Miller AH. Immune system to brain signaling: neuropsychopharmacological implications. *Pharmacol Ther* [Internet]. 2011 May [cited 2017 Jan 13];130(2):226–38. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0163725811000477>
46. Hanson DR, Gottesman II. Theories of schizophrenia: a genetic-inflammatory-vascular synthesis. *BMC Med Genet* [Internet]. 2005 Feb 11 [cited 2017 Jan 13];6(1):7. Available from: <http://bmcmmedgenet.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2350-6-7>
47. Drexhage RC, Knijff EM, Padmos RC, Heul-Nieuwenhuijzen L van der, Beumer W, Versnel MA, et al. The mononuclear phagocyte system and its cytokine inflammatory networks in schizophrenia and bipolar disorder. *Expert Rev Neurother* [Internet]. 2010 Jan 9 [cited 2017 Jan 13];10(1):59–76. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1586/ern.09.144>
48. Drexhage RC, van der Heul-Nieuwenhuijzen L, Padmos RC, van Beveren N, Cohen D, Versnel MA,

- et al. Inflammatory gene expression in monocytes of patients with schizophrenia: overlap and difference with bipolar disorder. A study in naturalistically treated patients. *Int J Neuropsychopharmacol* [Internet]. 2010 Nov 15 [cited 2017 Jan 13];13(10):1369–81. Available from: <http://ijnp.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1017/S1461145710000799>
49. Richard MD, Brahm NC. Schizophrenia and the immune system: Pathophysiology, prevention, and treatment. *Am J Heal Pharm* [Internet]. 2012 May 1 [cited 2017 Jan 13];69(9):757–66. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22517021>
  50. Fillman SG, Cloonan N, Miller LC, Weickert CS. Markers of inflammation in the prefrontal cortex of individuals with schizophrenia. *Mol Psychiatry* [Internet]. 2013 Feb [cited 2017 Jan 13];18(2):133–133. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23344565>
  51. Mondelli V, Cattaneo A, Belvederi Murri M, Di Forti M, Handley R, Hepgul N, et al. Stress and inflammation reduce brain-derived neurotrophic factor expression in first-episode psychosis: a pathway to smaller hippocampal volume. *J Clin Psychiatry* [Internet]. 2011 Dec 15 [cited 2017 Jan 13];72(12):1677–84. Available from: <http://article.psychiatrist.com/?ContentType=START&ID=10007410>
  52. Zhang XY, Cao LY, Song C, Wu GY, Chen DC, Qi LY, et al. Lower serum cytokine levels in smokers than nonsmokers with chronic schizophrenia on long-term treatment with antipsychotics. *Psychopharmacology (Berl)* [Internet]. 2008 Dec 22 [cited 2017 Jan 13];201(3):383–9. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00213-008-1295-4>
  53. Kim YK, Kim L, Lee MS. Relationships between interleukins, neurotransmitters and psychopathology in drug-free male schizophrenics. *Schizophr Res* [Internet]. 2000 Sep 1 [cited 2017 Jan 13];44(3):165–75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10962218>
  54. Garcia-Rizo C, Fernandez-Egea E, Oliveira C, Justicia A, Bernardo M, Kirkpatrick B. Inflammatory markers in antipsychotic-naïve patients with nonaffective psychosis and deficit vs. nondeficit features. *Psychiatry Res* [Internet]. 2012 Jul 30 [cited 2017 Jan 13];198(2):212–5. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165178111006081>
  55. Harris LW, Pietsch S, Cheng TMK, Schwarz E, Guest PC, Bahn S. Comparison of Peripheral and Central Schizophrenia Biomarker Profiles. Hashimoto K, editor. *PLoS One* [Internet]. 2012 Oct 30 [cited 2017 Jan 13];7(10):e46368. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23118852>
  56. Hickie IB, Banati R, Stewart CH, Stewart CH, Lloyd AR. Are common childhood or adolescent infections risk factors for schizophrenia and other psychotic disorders? *Med J Aust* [Internet]. 2009 Feb 16 [cited 2017 Jan 13];190(4 Suppl):S17–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19220168>

57. O'Donnell P. Cortical interneurons, immune factors and oxidative stress as early targets for schizophrenia. *Eur J Neurosci* [Internet]. 2012 Jun [cited 2017 Jan 13];35(12):1866–70. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1460-9568.2012.08130.x>
58. Noll R. Historical review: Autointoxication and focal infection theories of dementia praecox. *World J Biol Psychiatry* [Internet]. 2004 Apr [cited 2017 Jan 13];5(2):66–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15179665>
59. Menninger KA. Influenza and schizophrenia. An analysis of post-influenzal "dementia praecox," as of 1918, and five years later further studies of the psychiatric aspects of influenza. 1926. *Am J Psychiatry* [Internet]. 1994 Jun [cited 2017 Jan 13];151(6 Suppl):182–7. Available from: <http://psychiatryonline.org/doi/abs/10.1176/ajp.151.6.182>
60. Torrey EF, Leweke MF, Schwarz MJ, Mueller N, Bachmann S, Schroeder J, et al. Cytomegalovirus and schizophrenia. *CNS Drugs* [Internet]. 2006 [cited 2017 Jan 13];20(11):879–85. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17044725>
61. Bártová L, Rajcáni J, Pogády J. Herpes simplex virus antibodies in the cerebrospinal fluid of schizophrenic patients. *Acta Virol* [Internet]. 1987 Sep [cited 2017 Jan 13];31(5):443–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2891284>
62. Torrey EF, Bartko JJ, Lun Z-R, Yolken RH. Antibodies to *Toxoplasma gondii* in Patients With Schizophrenia: A Meta-Analysis. *Schizophr Bull* [Internet]. 2007 Mar 19 [cited 2017 Jan 13];33(3):729–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17085743>
63. Khandaker GM, Pearson RM, Zammit S, Lewis G, Jones PB. Association of serum interleukin 6 and C-reactive protein in childhood with depression and psychosis in young adult life: a population-based longitudinal study. *JAMA psychiatry* [Internet]. 2014 Oct 1 [cited 2017 Jan 13];71(10):1121–8. Available from: <http://archpsyc.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jamapsychiatry.2014.1332>
64. Dantzer R, Konsman J-P, Bluthé R-M, Kelley KW. Neural and humoral pathways of communication from the immune system to the brain: parallel or convergent? *Auton Neurosci* [Internet]. 2000 Dec 20 [cited 2017 Jan 13];85(1–3):60–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11189027>
65. Vitkovic L, Konsman JP, Bockaert J, Dantzer R, Homburger V, Jacque C. Cytokine signals propagate through the brain. *Mol Psychiatry* [Internet]. 2000 Nov [cited 2017 Jan 13];5(6):604–15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11126391>
66. D'Mello C, Le T, Swain MG. Cerebral microglia recruit monocytes into the brain in response to tumor necrosis factor $\alpha$  signaling during peripheral organ inflammation. *J Neurosci* [Internet]. 2009 Feb 18 [cited 2017 Jan 13];29(7):2089–102. Available from:

<http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.3567-08.2009>

67. Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol* [Internet]. 2007 Jan 10 [cited 2017 Jan 13];81(1):1–5. Available from: <http://www.jleukbio.org/cgi/doi/10.1189/jlb.0306164>
68. Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* [Internet]. 2001 Aug 1 [cited 2017 Jan 13];2(8):675–80. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11477402>
69. Contra, Ramzi S; Vinay, Kumar; Collins T. Acute and Chronic Inflammation. In: Robbins Pathologic Basics of Disease. 6th ed. Philadelphia; 1998. p. 50–88.
70. Karin M, Lawrence T, Nizet V. Innate immunity gone awry: linking microbial infections to chronic inflammation and cancer. *Cell* [Internet]. 2006 Feb 24 [cited 2017 Jan 13];124(4):823–35. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867406001917>
71. Grage-Griebenow E, Flad HD, Ernst M. Heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets. *J Leukoc Biol* [Internet]. 2001 Jan [cited 2017 Jan 13];69(1):11–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11200054>
72. Avraham-Davidi I, Yona S, Grunewald M, Landsman L, Cochain C, Silvestre JS, et al. On-site education of VEGF-recruited monocytes improves their performance as angiogenic and arteriogenic accessory cells. *J Exp Med* [Internet]. 2013 Nov 18 [cited 2017 Feb 2];210(12):2611–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24166715>
73. Wells CA, Chalk AM, Forrest A, Taylor D, Waddell N, Schroder K, et al. Alternate transcription of the Toll-like receptor signaling cascade. *Genome Biol* [Internet]. 2006 [cited 2017 Jan 13];7(2):R10. Available from: <http://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/gb-2006-7-2-r10>
74. Ziegler-Heitbrock HWL, Ulevitch RJ. CD14: Cell surface receptor and differentiation marker. *Immunol Today* [Internet]. 1993 Jan [cited 2017 Jan 13];14(3):121–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7682078>
75. van Furth R, Cohn ZA. The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *J Exp Med* [Internet]. 1968 Sep 1 [cited 2017 Jan 16];128(3):415–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5666958>
76. Tucker SB, Pierre R V, Jordon RE. Rapid identification of monocytes in a mixed mononuclear cell preparation. *J Immunol Methods* [Internet]. 1977 [cited 2017 Jan 16];14(3–4):267–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/65435>
77. Hettinger J, Richards DM, Hansson J, Barra MM, Joschko A-C, Krijgsveld J, et al. Origin of



- monocytes and macrophages in a committed progenitor. *Nat Immunol* [Internet]. 2013 Aug 30 [cited 2017 Jan 16];14(8):821–30. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ni.2638>
78. Feng A-L, Zhu J-K, Sun J-T, Yang M-X, Neckenig MR, Wang X-W, et al. CD16+ monocytes in breast cancer patients: expanded by monocyte chemoattractant protein-1 and may be useful for early diagnosis. *Clin Exp Immunol* [Internet]. 2011 Apr [cited 2017 Feb 2];164(1):57–65. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2249.2011.04321.x>
  79. Cros J, Cagnard N, Woollard K, Patey N, Zhang S-Y, Senechal B, et al. Human CD14dim monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity* [Internet]. 2010 Sep 24 [cited 2017 Jan 13];33(3):375–86. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761310003171>
  80. Cheng YX, Foster B, Holland SM, Klion AD, Nutman TB, Casale TB, et al. CD2 identifies a monocyte subpopulation with immunoglobulin E-dependent, high-level expression of Fc epsilon RI. *Clin Exp Allergy* [Internet]. 2006 Nov [cited 2017 Jan 16];36(11):1436–45. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2222.2006.02578.x>
  81. Di Pucchio T, Lapenta C, Santini SM, Logozzi M, Parlato S, Belardelli F. CD2+/CD14+ monocytes rapidly differentiate into CD83+ dendritic cells. *Eur J Immunol* [Internet]. 2003 Feb [cited 2017 Jan 16];33(2):358–67. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/immu.200310010>
  82. Takamizawa M, Rivas A, Fagnoni F, Benike C, Kosek J, Hyakawa H, et al. Dendritic cells that process and present nominal antigens to naive T lymphocytes are derived from CD2+ precursors. *J Immunol* [Internet]. 1997 Mar 1 [cited 2017 Jan 16];158(5):2134–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9036958>
  83. Shortman K, Naik SH. Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2007 Jan 15 [cited 2017 Jan 16];7(1):19–30. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nri1996>
  84. Ziegler-heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Derek N, et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood*. 2014;116(16):5–7.
  85. Grozdanov V, Bliederaeuser C, Ruf WP, Roth V, Zondler L, Brenner D, et al. Inflammatory dysregulation of blood monocytes in Parkinson ' s disease patients. 2014;651–63.
  86. Guerreiro RJ, Santana I, Brás JM, Santiago B, Paiva A, Oliveira C. Peripheral inflammatory cytokines as biomarkers in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Neurodegener Dis*. 2007;4(6):406–12.
  87. Kouwenhoven M, Teleshova N, Özenci V, Press R, Link H. Monocytes in multiple sclerosis:

- Phenotype and cytokine profile. *J Neuroimmunol*. 2001;112(1–2):197–205.
88. Saleh MN, Goldman SJ, LoBuglio a F, Beall AC, Sabio H, McCord MC, et al. CD16+ monocytes in patients with cancer: spontaneous elevation and pharmacologic induction by recombinant human macrophage colony-stimulating factor. *Blood*. 1995;85(10):2910–7.
  89. Dimitrov S, Shaikh F, Pruitt C, Green M, Wilson K, Beg N, et al. Differential TNF production by monocyte subsets under physical stress: blunted mobilization of proinflammatory monocytes in prehypertensive individuals. *Brain Behav Immun* [Internet]. 2013 Jan [cited 2017 Jul 6];27(1):101–8. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0889159112004643>
  90. Belge K-U, Dayyani F, Horelt A, Siedlar M, Frankenberger M, Frankenberger B, et al. The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF. *J Immunol* [Internet]. 2002 Apr 1 [cited 2017 Jul 6];168(7):3536–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11907116>
  91. Carneiro T, Gomes D, Pinto LA, Inês L, Lopes A, Henriques A, et al. Sera from patients with active systemic lupus erythematosus patients enhance the toll-like receptor 4 response in monocyte subsets. *J Inflamm (Lond)* [Internet]. 2015;12(May):38. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4451730&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
  92. Cuesta, M., Fonseca, E., Vallejo, G., & Muñiz J. Datos perdidos y propiedades psicométricas en los tests de personalidad. 2013;29:285–92.
  93. Kim OY, Monsel A, Bertrand M, Coriat P, Cavillon J-M, Adib-Conquy M. Differential down-regulation of HLA-DR on monocyte subpopulations during systemic inflammation. *Crit Care*. 2010;14(2):R61.
  94. Radewicz K, Garey LJ, Gentleman SM, Reynolds R. Increase in HLA-DR immunoreactive microglia in frontal and temporal cortex of chronic schizophrenics. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2000;59(2):137–50.
  95. Frommberger UH, Bauer J, Haselbauer P, Fräulin A, Riemann D, Berger M. Interleukin-6-(IL-6) plasma levels in depression and schizophrenia: comparison between the acute state and after remission. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* [Internet]. 1997 [cited 2017 Aug 19];247(4):228–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9332905>
  96. Kirkpatrick B, Miller BJ. Inflammation and schizophrenia. *Schizophr Bull*. 2013;39(6):1174–9.
  97. Pae C-U, Yoon C-H, Kim T-S, Kim J-J, Park S-H, Lee C-U, et al. Antipsychotic treatment may alter T-helper (TH) 2 arm cytokines. *Int Immunopharmacol* [Internet]. 2006 Apr [cited 2017 Aug 19];6(4):666–71. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567576905002912>

98. Akiyama K. Serum levels of soluble IL-2 receptor alpha, IL-6 and IL-1 receptor antagonist in schizophrenia before and during neuroleptic administration. *Schizophr Res* [Internet]. 1999 May 4 [cited 2017 Aug 19];37(1):97–106. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10227112>
99. Zhang XY, Zhou DF, Zhang PY, Wu GY, Cao LY, Shen YC. Elevated interleukin-2, interleukin-6 and interleukin-8 serum levels in neuroleptic-free schizophrenia: association with psychopathology. *Schizophr Res* [Internet]. 2002 Oct 1 [cited 2017 Aug 19];57(2–3):247–58. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12223256>
100. Frydecka D, Misiak B, Pawlak-Adamska E, Karabon L, Tomkiewicz A, Sedlaczek P, et al. Interleukin-6: the missing element of the neurocognitive deterioration in schizophrenia? The focus on genetic underpinnings, cognitive impairment and clinical manifestation. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* [Internet]. 2014 Sep 12 [cited 2017 Aug 19];265(6):449–59. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25214388>
101. Chase KA, Cone JJ, Rosen C, Sharma RP. The value of interleukin 6 as a peripheral diagnostic marker in schizophrenia. *BMC Psychiatry* [Internet]. 2016;16(1):152. Available from: <http://bmcp psychiatry.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12888-016-0866-x>
102. Francesconi LP, Ceresér KM, Mascarenhas R, Stertz L, Gama CS, Belmonte-de-Abreu P. Increased annexin-V and decreased TNF- $\alpha$  serum levels in chronic-medicated patients with schizophrenia. *Neurosci Lett* [Internet]. 2011 Sep 20 [cited 2017 Aug 19];502(3):143–6. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030439401100975X>
103. Naudin J, Capo C, Giusano B, Mège JL, Azorin JM. A differential role for interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha in schizophrenia? *Schizophr Res*. 1997;26(2–3):227–33.
104. Coelho FM, Reis HJ, Nicolato R, Romano-Silva MA, Teixeira MM, Bauer ME, et al. Increased serum levels of inflammatory markers in chronic institutionalized patients with schizophrenia. *Neuroimmunomodulation* [Internet]. 2008 [cited 2017 Aug 19];15(2):140–4. Available from: <https://www.karger.com/?doi=10.1159/000148197>
105. Kunz M, Ceresér KM, Goi PD, Fries GR, Teixeira AL, Fernandes BS, et al. Serum levels of IL-6, IL-10 and TNF- $\alpha$  in patients with bipolar disorder and schizophrenia: differences in pro- and anti-inflammatory balance. *Rev Bras Psiquiatr* [Internet]. 2011 Sep [cited 2017 Aug 19];33(3):268–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21971780>
106. Pedrini M, Massuda R, Fries GR, de Bittencourt Pasquali MA, Schnorr CE, Moreira JCF, et al. Similarities in serum oxidative stress markers and inflammatory cytokines in patients with overt schizophrenia at early and late stages of chronicity. *J Psychiatr Res* [Internet]. 2012 Jun [cited 2017 Aug 19];46(6):819–24. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002239561200101X>

107. Schmitt A, Bertsch T, Tost H, Bergmann A, Henning U, Klimke A, et al. Increased serum interleukin-1beta and interleukin-6 in elderly, chronic schizophrenic patients on stable antipsychotic medication. *Neuropsychiatr Dis Treat* [Internet]. 2005 Jun [cited 2017 Aug 19];1(2):171–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18568063>
108. MacDowell K, Caso J, Martín-Hernández D, Madrigal J, Leza J, García-Bueno B. Paliperidone Prevents Brain Toll-Like Receptor 4 Pathway Activation and Neuroinflammation in Rat Models of Acute and Chronic Restraint Stress. *Int J Neuropsychopharmacol* [Internet]. 2015 Feb [cited 2017 Aug 20];18(3). Available from: <https://academic.oup.com/ijnp/article-lookup/doi/10.1093/ijnp/pyu070>
109. Song C, Lin A h, Kenis G, Bosmans E, Maes M. Immunosuppressive effects of clozapine and haloperidol: enhanced production of the interleukin-1 receptor antagonist. *Schizophr Res* [Internet]. 2000 Apr 7 [cited 2017 Aug 20];42(2):157–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10742653>
110. Mudde GC, Van Reijssen FC, Boland GJ, de Gast GC, Bruijnzeel PL, Bruijnzeel-Koomen CA. Allergen presentation by epidermal Langerhans' cells from patients with atopic dermatitis is mediated by IgE. *Immunology* [Internet]. 1990 Mar [cited 2017 Aug 20];69(3):335–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2179131>
111. Bieber T. FcεRI on antigen-presenting cells. *Curr Opin Immunol* [Internet]. 1996 Dec [cited 2017 Aug 20];8(6):773–7. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0952791596800033>
112. Sharquie IK, Al-Ghouleh A, Fitton P, Clark MR, Armour KL, Sewell HF, et al. An investigation into IgE-facilitated allergen recognition and presentation by human dendritic cells. *BMC Immunol* [Internet]. 2013;14(1):54. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3883479&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
113. Manuscript A, Patients HF. *NIH Public Access*. 2014;19(6):431–44.
114. Ramchand R, Wei J, Ramchand CN, Hemmings GP. Increased serum IgE in schizophrenic patients who responded poorly to neuroleptic treatment. *Life Sci* [Internet]. 1994 [cited 2017 Aug 20];54(21):1579–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7910931>
115. Lin A, Kenis G, Bignotti S, Tura GJ, De Jong R, Bosmans E, et al. The inflammatory response system in treatment-resistant schizophrenia: increased serum interleukin-6. *Schizophr Res* [Internet]. 1998 Jun 22 [cited 2017 Aug 20];32(1):9–15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9690329>
116. Arolt V, Weitzsch C, Wilke I, Nolte A, Pinnow M, Rothermundt M, et al. Production of interferon-

- gamma in families with multiple occurrence of schizophrenia. *Psychiatry Res* [Internet]. 1997 Feb 7 [cited 2017 Aug 20];66(2–3):145–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9075278>
117. Buckley PF, Pillai A, Howell KR. Brain-derived neurotrophic factor: findings in schizophrenia. *Curr Opin Psychiatry* [Internet]. 2011 Mar [cited 2017 Aug 20];24(2):122–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21248641>
  118. Balaratnasingam S, Janca A. Brain Derived Neurotrophic Factor: A novel neurotrophin involved in psychiatric and neurological disorders. *Pharmacol Ther* [Internet]. 2012 Apr [cited 2017 Aug 20];134(1):116–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22281237>
  119. Chen DC, Wang J, Wang B, Yang SC, Zhang CX, Zheng YL, et al. Decreased levels of serum brain-derived neurotrophic factor in drug-naïve first-episode schizophrenia: relationship to clinical phenotypes. *Psychopharmacology (Berl)* [Internet]. 2009 Dec 29 [cited 2017 Aug 20];207(3):375–80. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00213-009-1665-6>
  120. Shoval G, Weizman A. The possible role of neurotrophins in the pathogenesis and therapy of schizophrenia. *Eur Neuropsychopharmacol* [Internet]. 2005 May [cited 2017 Aug 20];15(3):319–29. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15820422>
  121. Chalidakov GN, Fiore M, Stankulov IS, Manni L, Hristova MG, Antonelli A, et al. Neurotrophin presence in human coronary atherosclerosis and metabolic syndrome: a role for NGF and BDNF in cardiovascular disease? *Prog Brain Res* [Internet]. 2004 [cited 2017 Aug 20];146:279–89. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079612303460184>
  122. Mondelli V, Cattaneo A, Murri MB, Di Forti M, Handley R, Hepgul N, et al. Stress and inflammation reduce brain-derived neurotrophic factor expression in first-episode psychosis: a pathway to smaller hippocampal volume. *J Clin Psychiatry* [Internet]. 2011 Dec 15 [cited 2017 Aug 20];72(12):1677–84. Available from: <http://article.psychiatrist.com/?ContentType=START&ID=10007410>
  123. Teixeira AL, Reis HJ, Nicolato R, Brito-Melo G, Correa H, Teixeira MM, et al. Increased serum levels of CCL11/eotaxin in schizophrenia. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry*. 2008;32(3):710–4.
  124. Konopaske GT. Chapter 39 – Schizophrenia. In: *Neurobiology of Brain Disorders*. 2015. p. 639–54.
  125. Khandaker GM, Dantzer R. Is there a role for immune-to-brain communication in schizophrenia? *Psychopharmacology (Berl)*. 2016;233(9):1559–73.
  126. Haroon E, Raison CL, Miller AH. Psychoneuroimmunology meets neuropsychopharmacology: translational implications of the impact of inflammation on behavior.

Neuropsychopharmacology [Internet]. 2012 Jan 14 [cited 2017 Aug 13];37(1):137–62. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/npp.2011.205>

127. Sharquie IK, Al-Ghouleh A, Fitton P, Clark MR, Armour KL, Sewell HF, Shakib F, Ghaemmaghami AM<sup>1</sup>. An investigation into IgE-facilitated allergen recognition and presentation by human dendritic cells.  
  
128. Shin J-S, Greer AM, The role of FcεRI expressed in dendritic cells and monocytes. *Cell Mol Life Sci*: 2015;72(12):2349-60
129. Pyle DM, Yang VS, Gruchalla RS, Farrar JD, Gill MA. IgE cross-linking critically impairs human monocyte function by blocking phagocytosis. *J Allergy Clin Immunol*. 2013 Feb;131(2):491-500