

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS: PSIQUIATRIA
INCT EM MEDICINA TRANSLACIONAL**

O Uso da Amantadina na Esquizofrenia

David Freitas de Lucena

Orientadora: Clarissa Severino gama

Janeiro 2012

CIP - Catalogação na Publicação

Freitas de Lucena, David
Uso da Amantadina na Esquizofrenia / David
Freitas de Lucena. -- 2012.
150 f.

Orientadora: Clarissa Severino Gama.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Psiquiatria, Porto Alegre, BR-RS, 2012.

1. Esquizofrenia. 2. Psicose. 3. Estresse Oxidativo. 4. Amantadina. 5. Memantina. I. Severino Gama, Clarissa, orient. II. Título.

Agradecimentos

Aos meus pais, Mairton e Valeria Lucena, por todo o suporte e carinho.

À Clarissa Gama, minha mentora acadêmica, com genuína admiração.

*“ Os homens! É preciso amar os homens.
Os homens são admiráveis.
... E de repente aqui está ela: a Náusea.*

Então é isso a Náusea: essa Evidência Ofuscante? Existo - o mundo existe - e sei que o mundo existe. Isso é tudo. Mas tanto faz para mim. É estranho que tudo me seja tão indiferente: isso me assusta.

Gostaria tanto de me abandonar, de deixar de ter consciência de minha existência, de dormir. Mas não posso, sufoco: a existência penetra em mim por todos os lados, pelos olhos, pelo nariz, pela boca... e subitamente, de repente, o véu se rasga: compreendi, vi.

A Náusea não me abandonou, e não creio que me abandone tão cedo; mas já não estou submetido a ela, já não se trata de uma doença, nem de um acesso passageiro: a Náusea sou eu.”

(Descrição de um episódio psicótico) - Jean Paul Sartre

Sumário

1. Abreviaturas e Siglas	05.
2. Resumo	07.
2.1 Abstract	09.
3. Introdução	11.
4. Revisão da Literatura	12.
4.1. Esquizofrenia	13.
4.2. Da Dopamina ao Glutamato: Teorias Sobre os Estados Psicóticos	14.
4.3 O Sistema NMDA, Hipótese Integradora e o Uso da Amantadina	18.
4.4 Uma Nova Possibilidade Terapêutica: Amantadina	23.
4.5 Inflamação e Sistema Glutamatérgico: A Origem dos Sintomas?	33
4.6 Referências Bibliográficas	35.
5. Objetivos do Estudo	48.
5.1 Aspectos Éticos	49.
6. Artigos	
6.1 Artigo 1 - Inglês	51.
6.2 Artigo 1 - Português	65.
6.3 Artigo 2 - Inglês	76.
6.4 Artigo 2 - Português	101.
6.5 Artigo 3 - Anexo	129.
7. Conclusões e Considerações Finais	133.
8. Anexos	135.

1. Abreviaturas e Siglas

ANOVA - Análises de Variância

AMPA - Receptor α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico

AMA- Amantadina

BFCRS - Bush-Francis Catatonia Rating Scale

BDNF- Brain Derived Neurotrophic Factor

CID-10 - Classificação Internacional de Doenças

CPK - Creatina-fosfo-quinase

DSM-IV - Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais

ECT - Eletroconvulsoterapia

FDA - Food and Drug Administration

MGLUT - Receptor Metabotrópico de Glutamato

KET - Cetamina/Ketamina

LPS - Lipopolissacarídeo Bacteriano

MEM - Memantina

NMDA - Receptor N-metil-D-aspartato de Glutamato

PCP - Fenilciclidina

PF - Córtex Frontal

PFC - Córtex Pré-Frontal

PFCML - Córtex Pré-Frontal Médio-Lateral

SAL - Salina

SAS - Simpson-Angus Scale

SZ - Esquizofrenia

SZA - Esquizo-Afetivo

WISTAR - Variedade de Ratos *Rattus norvegicus*.

2. Resumo

Novos tratamentos para a esquizofrenia são desejados devido a baixa resposta terapêutica dos fármacos atuais. Através de revisão sistemática da literatura e estudos anteriores realizados pelo Programa de Demências e Esquizofrenias da UFRGS, os adamantanos (memantina e amantadina), vêm mostrando-se como moléculas promissoras principalmente para pacientes refratários ao uso convencional de neurolépticos. Inicialmente são abordados os principais mecanismos neurobiológicos e farmacológicos possivelmente responsáveis pelo funcionamento da amantadina no cérebro dos pacientes tratados. O primeiro destes estudos realizados teve como objetivo avaliar o uso da amantadina em pacientes gravemente enfermos em episódio catatônico, que não foram candidatos ao tratamento através de eletroconvulsoterapia por restrição familiar. A amantadina foi capaz de, em altas doses, reverter a maioria destes quadros.

Em outra fase da tese, foi realizado tratamento de ratos Wistar com amantadina, em um modelo animal de esquizofrenia. A amantadina foi capaz de reverter parcialmente os sintomas esquizofreniformes causados pelo modelo de cetamina, apesar do aumento de atividade dos complexos mitocondriais.

Também foi realizado um estudo piloto do uso de amantadina para pacientes com esquizofrenia e predomínio de sintomas negativos, com boa resposta dos pacientes selecionados. Este estudo inicial deu origem a um

ensaio duplo cego randomizado controlado com placebo, que atualmente esta em curso, com previsão de término em 2012.

Como conclusões temos que a amantadina mostra-se um fármaco de propriedades únicas, que deve ser melhor investigada, tendo um papel importante para um grupo de pacientes que são refratários às medicações mais clássicas, sendo uma esperança futura para prevenir a degeneração neuronal e curso para demência nestes indivíduos refratários.

2.1 Abstract

New treatments for schizophrenia are desired due to poor therapeutic response to drugs in current use. A systematic review of the literature and previous studies of our group at UFRGS discovered that the adamantanes (amantadine and memantine), are promising molecules, mainly for patients refractory to conventional use of neuroleptics. Initially in this thesis we explain the neurobiological and pharmacological mechanisms that may be responsible for the mechanism of action of amantadine in the brain. In the first of these studies, the objective was to evaluate the use of amantadine in critically ill patients in catatonic episode, which were not candidates for electroconvulsive treatment.

Amantadine was able to reverse most of these catatonic episodes. In another phase of the thesis, we conducted a trial in Wistar rats treated with amantadine, in an animal model of schizophrenia. The Amantadine was able to partially reverse the symptoms caused by ketamine, despite an increase in mitochondrial complexes, with the significance remains unclear. It was also carried out a pilot study of the use of amantadine in patients with schizophrenia and predominantly negative symptoms, and we achieved a good response of selected patients. This initial study led to a double-blind randomized placebo controlled trial which is under way with expected completion in 2012. Finally, our

findings have shown that amantadine is a drug of unique properties that should be better investigated because it has an important role in a group of patients who are refractory to more traditional medications. Amantadine could also be a future hope to prevent neuronal degeneration and a course for dementia in these refractory patients.

3. Introdução

A psicose sempre suscitou curiosidade, temor e fascínio. Desde a época em que os psicóticos eram confinados em embarcações errantes, conforme retratado na famosa tela “Nau dos loucos”, de Hieronymus Bosch, este estado patológico é associado aos medos mais profundos do homem, ao lado da morte. Mas também já foi cantada como elemento contingente da vida humana, em épocas mais remotas. Ao ser transformada em objeto de estudos pela psiquiatria, perdeu a dimensão de expressão da vida humana e foi caracterizada como a mais grave doença mental. Assim como a finitude da vida, as psicoses, e mais especificamente a esquizofrenia é uma entidade que ainda foge do controle das ciências médicas. O sofrimento de pacientes e familiares é indescritível e poucos recursos estão disponíveis. A psiquiatria parece estar apenas ensaiando seus passos, quando comparada a outras especialidades médicas.

Diante deste quadro, uma nova possibilidade terapêutica mostra-se importante pela possibilidade de trazer maior conforto e reabilitação social aos pacientes.

4. Revisão da Literatura

4.1. Esquizofrenia

Apesar de ser uma entidade nosológica há mais de um século, a esquizofrenia permanece como a mais grave enfermidade mental, na qual o tratamento muitas vezes se mostra apenas uma medida paliativa. Deste a introdução dos primeiros antipsicóticos, pouca mudança houve em termos efetivos para resolução desta patologia. A esquizofrenia é uma doença mental crônica, caracterizada por distorções do pensamento, delírios bizarros, alterações na sensopercepção, déficits cognitivos e respostas emocionais inadequadas, que podem levar o paciente a variados graus de deterioração demencial e a uma significativa mudança na qualidade de vida destes indivíduos. Critérios diagnósticos claros baseados em características fenomenológicas são apresentados no DSM IV (APA, 1994).

É uma doença que atinge de 1% até 4% da população, considerando todo seu espectro de sintomas (CID-10), e caracteriza-se por ser grave e produzir, inexoravelmente, comprometimento funcional cognitivo do indivíduo. Costuma ocorrer no final da adolescência e início da vida adulta, afetando ambos os sexos. A patologia tende a interferir no desempenho escolar e profissional destes pacientes, que terão dificuldade de ingressar na universidade, e doravante, de assumir posições de trabalho que exijam maior responsabilidade. Como

resultado, o status social e econômico destes pacientes é reduzido. O indivíduo, na maioria das vezes, torna-se incapaz de gerenciar sua vida e constitui, então, um ônus para sua rede social e o Estado (Üstün, 1999). As estimativas de gastos no Brasil ainda são incipientes, porém o último levantamento realizado somente no estado de São Paulo mostra que os gastos anuais em despesas hospitalares, farmacológicas e sociais são de aproximadamente 192 milhões de dólares com a esquizofrenia (Leitão et al, 1998)

Os sintomas da esquizofrenia envolvem uma série de disfunções cognitivas e emocionais que acometem a percepção, o raciocínio lógico, a linguagem, o controle comportamental, o afeto, a fluência do pensamento, a prosódia do discurso, a capacidade hedônica, os impulsos, a memória e a atenção. Nenhum sintoma isolado é patognomônico de esquizofrenia; o diagnóstico envolve o reconhecimento de uma constelação de sinais e sintomas associados com prejuízo no funcionamento ocupacional ou social. Estes sintomas podem ser divididos em critérios, onde os “critérios A” são subdivididos em sintomas positivos A₁ (delírios), A₂ (alucinações), A₃ (discurso desorganizado) e A₄ (comportamento amplamente desorganizado); e/ou negativos A₅ (embotamento afetivo, alogia e abulia) Os sintomas têm uma duração mínima de seis meses e incluem, no primeiro mês, um ou mais sintomas da fase ativa, ditos positivos, como: delírios, alucinações, discurso desorganizado, comportamento amplamente desorganizado ou catatônico, crises agressivas, agitação extrema e desagregação do pensamento; os

sintomas negativos também podem ocorrer, sendo estes: embotamento afetivo, dificuldade de julgamento, depressão e falta de motivação (APA, 1994).

No momento, não é possível prevenir a esquizofrenia. Dessa forma, o foco comum é o tratamento e a reabilitação do paciente. A farmacoterapia tem provado ser o ponto-chave na terapêutica. Embora não curativas, as drogas antipsicóticas se estabeleceram como o tratamento primário para todos os estágios da doença. Possibilitam uma redução no tempo de hospitalização e a possibilidade de manutenção dos pacientes por mais tempo em seus lares (Marder et al, 1991).

Entre 25% e 35% de todos os pacientes se mantêm refratários ao tratamento com antipsicóticos clássicos e cerca de 80% de todos os pacientes permanecem com sintomas negativos e cognitivos residuais (Davis, 1980; Haring et al., 1990). Mesmo com a alta frequência de sintomas persistentes em pacientes esquizofrênicos, poucos tratamentos alternativos têm surgido como auxílio efetivo.

4.2 Da Dopamina ao Glutamato: Teorias Sobre os Estados Psicóticos

Ao longo das últimas décadas houve um progresso no entendimento da fisiopatologia dos estados psicóticos esquizofreniformes. A primeira teoria a vigorar focava uma desregulação dos receptores de dopamina e surgiu através de análises do mecanismo de ação dos antipsicóticos (Delay et al, 1952) e

evidências que estes fármacos alteravam o metabolismo dos derivados de DOPA em modelos animais. (Carlsson et al, 1957 e 1963) Em seguida, uma série de experimentos comprovaram que administração de anfetaminas em modelos animais induziam estados psicóticos comparáveis a alguns sintomas da esquizofrenia. (Lieberman et al, 1970) Por volta do ano de 1976 a teoria dopaminérgica foi consolidada com a observação de que a potência das drogas antipsicóticas estava relacionada a sua capacidade de bloquear receptores de dopamina, em especial o sub-tipo D2 (Seeman et al, 1975 e 1976). Devido a insipiência tecnológica da época, não foi possível sugerir qualquer relação com outros neuro-transmissores, tampouco com teorias do desenvolvimento e funcionamento cerebral. Embora boa parte do quadro clínico e evolução dos pacientes permanecesse sem explicações contundentes, esta teoria permaneceu em vigor direcionando os tratamentos e classificações psicopatológicas da época. A teoria dopaminérgica teve grande importância heurística neste período, possibilitando o avanço científico necessário e possível até o aparecimento de novos dados que pudessem explicar de forma mais ampla a neurobiologia da esquizofrenia.

Cerca de 30 anos depois, novas evidências relacionando diferentes níveis de dopamina em regiões cerebrais específicas, achados de postmortem em cérebro de pacientes crônicos, imagens cerebrais obtidas através de exames funcionais e novos modelos animais levaram a comunidade científica a revisar a validade da hipótese dopaminérgica como teoria uníssona para a esquizofrenia

(Davidson et al 2003; McGuire et al, 2008; Moore et al 2003; Howes e Kapur, 2009). A importância dos receptores D2 também foi questionada com o reconhecimento claro de que a clozapina apresentava respostas clínicas superiores aos demais antipsicóticos disponíveis, apesar de bloquear parcialmente e em pequena potência estes mesmos receptores. (Davis et al, 1991) Na prática ambulatorial, a teoria dopaminérgica igualmente mostrava-se frágil ao novo entendimento clínico da esquizofrenia: a categorização de sintomas negativos, positivos, cognitivos e de humor. (Kapur, 2003)

A partir da observação atenta de que bloqueadores glutamatérgicos, como a Fenilciclidina (PCP) e a Ketamina (KET), eram capazes de induzir em humanos estados psicóticos que continham toda gama psicopatológica da esquizofrenia, abriu-se uma nova área de entendimento e hipóteses para a neurobiologia desses estados psicóticos (Umbricht et al, 2000). Foi então postulado que uma desregulação do sistema glutamatérgico, possivelmente mediados pelos receptores NMDA, estaria implicada na gênese da esquizofrenia. (Carlsson et al, 1988; Davis et al, 1991; Javitt et al, 1987 e 1991). Este modelo continua sendo intensamente estudado e já existem evidências de vários outros receptores glutamatérgicos ionotrópicos e metabotrópicos implicados na diátese da psicose, e atualmente é o mais utilizado modelo conceitual da esquizofrenia, apesar da existência de outros. (Olney et al, 1995; Coyle et al, 2004; Moghaddam et al, 2003; Heresco-Levy et al, 2005)

Os estudos iniciais realizados com PCP na década de 1960 mostraram déficits cognitivos que são altamente remissivos de esquizofrenia. Estudos realizados com Ketamina ao longo dos últimos 15 anos têm confirmado e estendido esses achados. (Krystal et al 1994 e 2004) Déficit foram observados em todos os domínios neuropsicológicos incluindo memória de trabalho, inibição da resposta de pré-pulso e processamento executivo. (Lahti et al 1995 e 2001) A infusão de ketamina também reproduz tanto a gravidade e o tipo de transtorno do pensamento visto na esquizofrenia, e esta associada clinicamente com altos níveis de pobreza de discurso, circunstancialidade, afrouxamento de ideias, perda de objetivo, baixos níveis de expressão emocional e parafasias (Malhotra et al 1996 e 1997; Parvani, 2005). Dada a importância da disfunção neurocognitiva para o diagnóstico da esquizofrenia, esses resultados apoiam o envolvimento etiológico do receptor NMDA na fisiopatologia desta doença. (Umbricht et al, 2000)

Em oposição à ketamina, a administração de agonistas dopaminérgicos, como a anfetamina não reproduz o padrão de déficit observado na esquizofrenia. Por exemplo, em um estudo recente que comparou diretamente efeitos da anfetamina e ketamina em voluntários normais, tanto a ketamina e a anfetamina induziam sintomatologia positiva e desorganização conceitual. No entanto, apenas as infusões de ketamina produziram mudanças de percepção, de pensamento e sintomas cognitivos. Além disso, apenas ketamina induzia disfunções de memória de trabalho e tempo de latência sensorial. Finalmente, a

anfetamina não induziu distúrbios neurocognitivos, e *de forma muito interessante, foi capaz de diminuir as perturbações causadas pela administração de ketamina previamente*. Estes achados sugerem que o acréscimo, em vez de bloqueio dopaminérgico córtico-frontal pode ser benéfico para os pacientes cronicamente enfermos (Barch et al, 2005). Na esquizofrenia, o tratamento com anfetaminas ou fármacos com mecanismos semelhantes as anfetaminas não parece prejudicar a cognição e pode de fato levar a melhoria cognitiva nesta patologia (Barch et al 2005, Gama e De Lucena, 2010, Sodré et al, 2010). Permaneceu, no entanto, uma lacuna na teoria: o que estaria causando o bloqueio glutamatérgico nos pacientes com esquizofrenia? Seria este o único mecanismo implicado nos sintomas esquizofreniformes? Onde se encaixariam as evidências de altera es inflamatórias e distúrbios de membrana celular nestes pacientes? Como veremos a seguir, haveria necessidade de uma explica o ainda mais abrangente para a fisiopatologia da esquizofrenia. No entanto, o sistema NMDA precisa ser melhor caracterizado, a priori.

4.3 O Sistema Glutamatérgico NMDA, Hipótese Integradora e o Uso da Amantadina

Os receptores NMDA são compostos tetrâmeros de uma combina o de sub-unidades distintas denominadas NR1, NR2 e NR3. Múltiplas partes variantes da sub-unidade NR1 têm sido descritas, com várias sub-formas da sub-unidade NR2 denominadas NR2-ABCD. Todos os receptores NMDA

possuem funcionalmente uma ou mais sub-unidades NR1. Além disso, a maioria dos receptores pode conter uma combinação de sub-unidades NR2, com NR2A e sub-unidades NR2B, sendo esta configuração dominante no cérebro adulto: NR1 + NR1 + NR2A + NR2B. (Kantrowitz and Javitt 2010)

Diferentes combinações de sub-unidades podem conferir propriedades diferentes para cada um dos receptores, e este dado é de extrema importância. Tem sido sugerido que dependendo das sub-unidades NR2A-D e NR3, que estão contidas nos receptores, estes podem ter papéis diferenciais na psicopatologia e resposta farmacológica. Esta configuração matemática fatorial dificulta a análise dos receptores NMDA. Por causa da falta de medicamentos que sejam sub-unidade específicos, é difícil para os pesquisadores determinar o envolvimento das diferentes sub-unidades na fisiopatologia da esquizofrenia e é possível que intervenções em subtipos seletivos de receptores resultarão em respostas clínicas mais favoráveis do que a modulação generalizada dos mesmos. Esta composição variável justifica também diferentes sintomas clínicos ligados a diferentes concentrações de glutamato no cérebro de pacientes com esquizofrenia. (Swerdlow 2011)

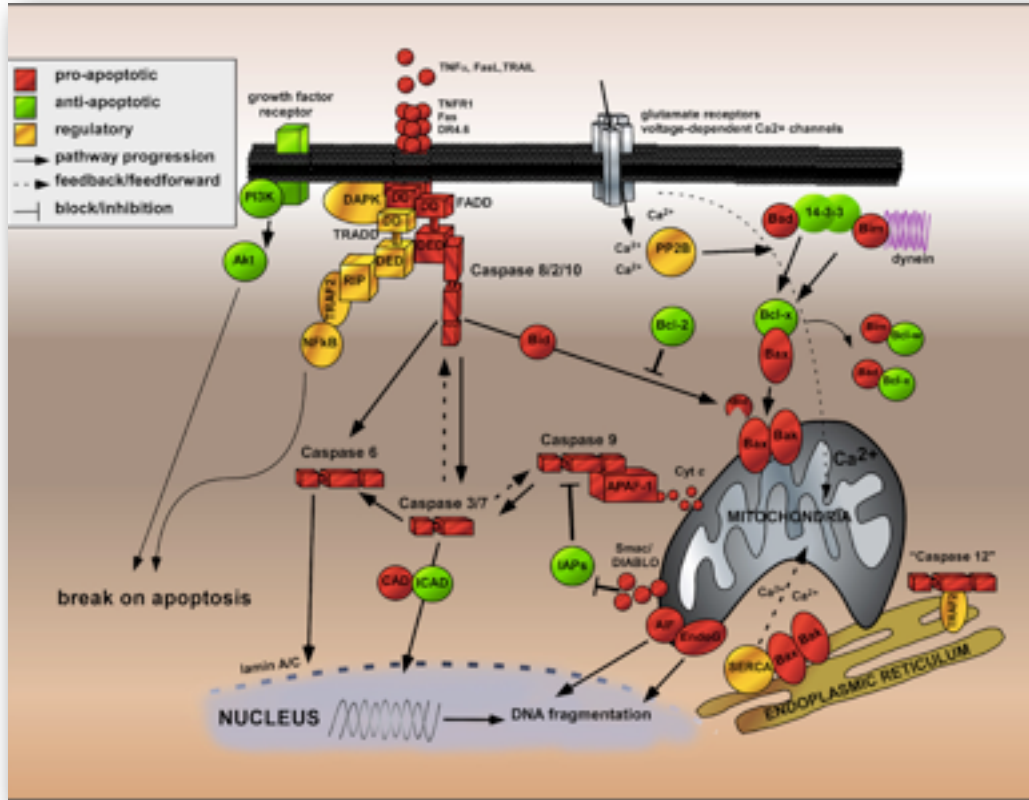
Estados hiperglutamatérgicos atuando nestes receptores NMDA seguem sendo estudados e implicados na fisiopatologia da esquizofrenia, principalmente no que se refere à morte neuronal por apoptose, a atrofia cortico-estriatal e a progressão inexorável para algum grau de demência nos pacientes com

predomínio de sintomas negativos e cognitivos, apesar do uso terapêutico de neurolépticos modernos. Postula-se que estas medicações não são capazes de abortar totalmente a progressão da doença em alguns pacientes. (Bressan & Pilowsky, 2003; De Lucena, 2009) O excesso de glutamato causaria excitação nos receptores N-Metil-D-Aspartato (NMDA), permitindo um fluxo excessivo de cálcio, principalmente, mas também de outros íons para dentro do neurônio por longos períodos (Figura 6). Este influxo iônico excessivo aumenta o estresse oxidativo intracelular, ocorrendo a ativação de cascatas enzimáticas de mensageiros apoptóticos (BAD-14, B-cl2, Bim, Bax e Bak) que podem causar peroxidação lipídica nos neurônios, com a ocorrência de morte neuronal.

Ainda há a possibilidade de níveis adequados de glutamato nos cérebro de pacientes com esquizofrenia, associados a receptores NMDA disfuncionais que reagem de maneira inadequada a fases tônicas de glutamato e glicina, ocasionando a mesma cascata de eventos descritas acima. De qualquer forma, o resultado parece ser o mesmo: morte neuronal e progressão para estados demenciais.

Este fato é comprovado de maneira indireta através da reprodução e comprovação que os pacientes com esquizofrenia apresentam maior peroxidação lipídica do que indivíduos sem esquizofrenia, e o nível de oxidação celular é diretamente proporcional a gravidade da psicose, conforme evidenciado em estudos prévios do nosso grupo (Gama et al, 2006; 2008a; 2008b; Kunz et al, 2008).

Figura 1.

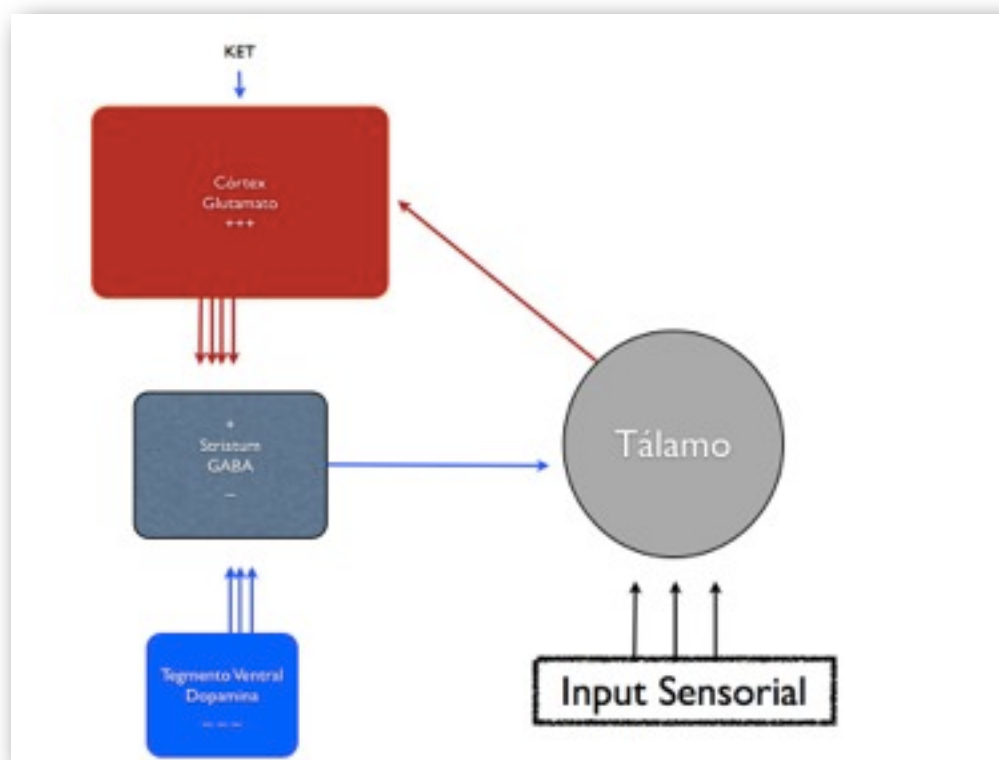


Modelo esquemático do Receptor NMDA com suas sub-unidades em corte bi-dimencional, e a cascata de eventos que levam a morte neuronal por apoptose. (Blanpied 2005)

No entanto, o glutamato em seus níveis elevados parecem não estar implicados em outros sintomas esquizofreniformes e isto vem sendo demonstrado através da complexa inter-relação entre diferentes níveis glutamatérgicos, regiões cerebrais específicas e evolução da psicose. (McNally et al 2011.) Outras evidências mostram, de forma seqüencial, que o tratamento crônico com inibidores NMDA (KET, PCP e MK-801) em ratos e cobaias levam a danos cognitivos, anatômicos e fisiopatológicos semelhantes aos encontrados em pacientes esquizofrênicos, e ao longo dos anos de doença o perfil

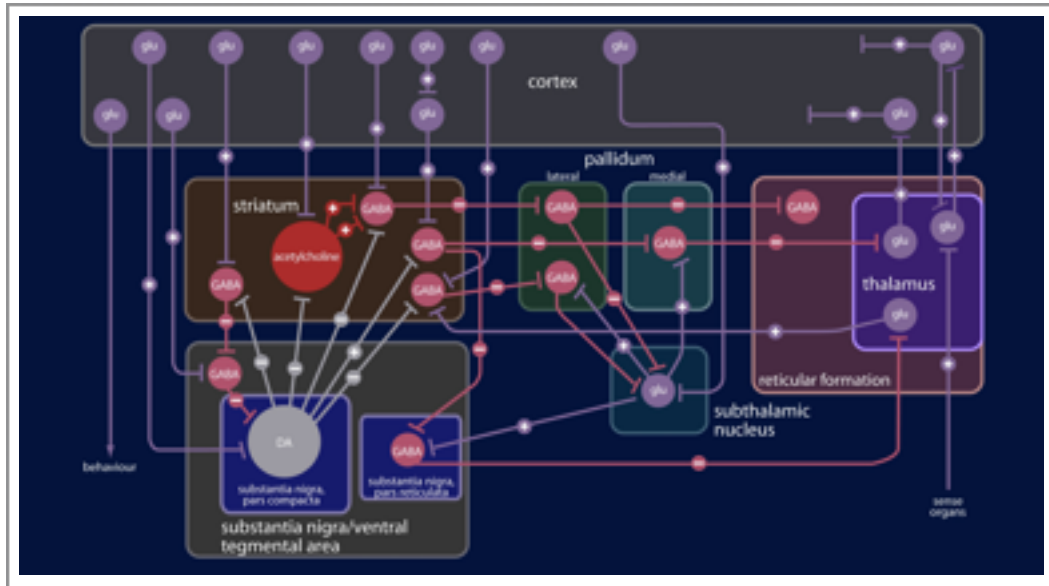
bioquímico de neurotransmissores e de conectividade neuronal é variável. (Karlsgodt et al, 2008.) Mais recentemente tem se sugerido uma hipótese integradora entre os sistemas dopaminérgico, glutamatérgico, gabaérgico, serotoninérgico e inflamatório, de modo que o modelo baseado numa disfunção glutamatérgica se mostra insuficiente para explicar o conjunto de sintomas esquizofreniformes. É importante destacar que estas hipóteses bioquímicas implicam em um modelo fisiopatológico anatômico (Figura 2A, B e C e Anexo). (Pickard 2011)

Figura 2A

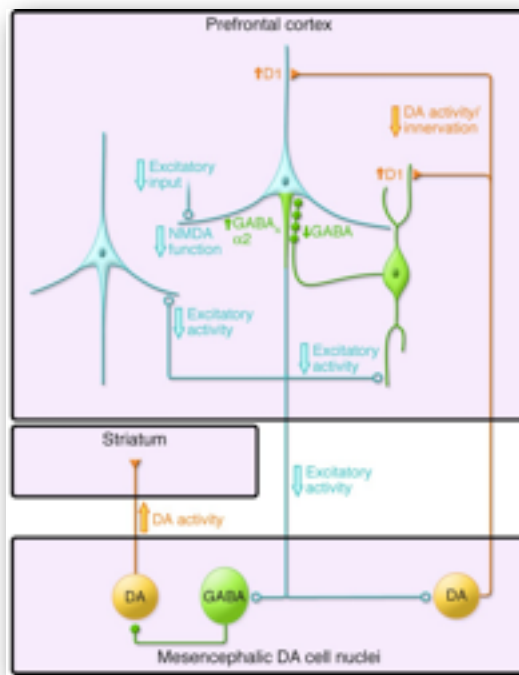


A hipótese integradora postula que existe um equilíbrio entre as vias dopaminérgicas inibitórias e as vias glutamatérgicas ativadoras do sistema GABA de Parvaalbumina. Este modelo de circuito neural interligado da via cortico-estriato-talâmico-cortical, integra a hipótese glutamatérgica, com a hipótese anatômica da desregulação do filtro talâmico. Temos que uma hipofunção da via glutamatérgica cortico-estriatal, irá indiretamente abrir o filtro talâmico, levando a uma entrada descontrolada de informações sensoriais para o córtex, e desta maneira, ao aparecimento da experiência psicótica. Adaptado de Pickard 2011

2B



2C



Circuito Neuronal esquemático expandido (B) mostrando a complexa regulação entre os neurotransmissores e regiões cerebrais implicados na esquizofrenia. A figura mostra um cérebro em funcionamento normal. (C) Aqui temos um modelo simplificado mostrando a possível cascata de eventos bioquímicos e anatómicos envolvidos na diátese da esquizofrenia. Lewis et al, 2009.

Como relatado anteriormente, em um ensaio clínico conduzido pelo nosso grupo (Lucena et al, 2009), foi demonstrado que o uso de memantina, um fármaco quimicamente análogo a amantadina, em doses terapêuticas, é uma opção promissora como adjuvante para pacientes com sintomas positivos e negativos refratários. Deste modo, baseado em resultados de alguns relatos de casos (Gama et al., 2009), na sua complexa regulação intracelular e monoaminérgica, (Allers et al., 2005; Tomitaka et al., 1995) também por sua ação antagonista parcial dos receptores N-Metil-D-Aspartato (NMDA); hipotetizamos que a amantadina pode ser útil no tratamento da esquizofrenia, principalmente dos sintomas negativos, como terapia adjuvante aos antipsicóticos.

4.4 Amantadina

A amantadina é uma amina tricíclica sintética hidrossolúvel descoberta por Wingfield em 1956 utilizada originalmente como antiviral na profilaxia e no tratamento de infecções pelo vírus *Influenza A*. Posteriormente, descobriu-se sua ação antiparkinsoniana, por meio de mecanismos que serão discutidos em seguida. É usada em monoterapia, ou em combinação a levodopa ou agonistas de receptores dopaminérgicos na doença de Parkinson precoce e avançada e em casos de sintomas extrapiramidais induzidos por substâncias. (Parkes et al, 1970).

Amantadina é um fármaco atualmente aprovado na psiquiatria somente para tratamento da doença de Parkinson. Porém há relatos de uso de sua classe

medicamentosa, exemplificada pela memantina em casos de catatonia grave (Thomas et al., 2005), bem como catatonia não responsiva ao uso de Eletroconvulsoterapia e na síndrome neuroléptica maligna (Parker et al., 2007; Kornhuber et al., 2006). Recentemente a amantadina se mostrou eficaz no tratamento de obesidade induzida por olanzapina (Deberdta et al., 2005). Além destas indicações, segue até os dias de hoje com uso estabelecido para profilaxia de infecções pelo vírus da Influenza A e seus diversos subtipos em nosso meio. (Galvão et al., 2009)

Constitui um derivado aromático da memantina (Duque et al., 2009; Lameh et al., 2007), uma droga aprovada pelo FDA para tratamento de demências de grau moderado a grave (Areosa et al., 2005; Lipton et al., 2007). Recentemente nosso grupo conseguiu bons resultados num ensaio duplo cego randomizado com placebo para avaliar uso da memantina em pacientes refratários em uso de clozapina e sintomas negativos residuais, com consequente melhora destes sintomas e da dimensão psicossocial dos pacientes, (Altman et al., 2001, Lucena et al., 2009), confirmando estudos anteriores nesta linha de pesquisa (Krivoy et al., 2008).

Novas evidências sobre a amantadina corroboram que a mesma possui atividade homeostática em neurônios com hipóxia aguda e crônica (Rogoz et al., 2004; Huber et al., 1999), contribui para aumento de neurotrofinas cerebrais principalmente o *Brain Derived Neurotrophic Factor* (BDNF) e *Glial Derived Neurotrophic Factor* (GDNF) (Morvanova et al., 2001) e estabiliza a membrana

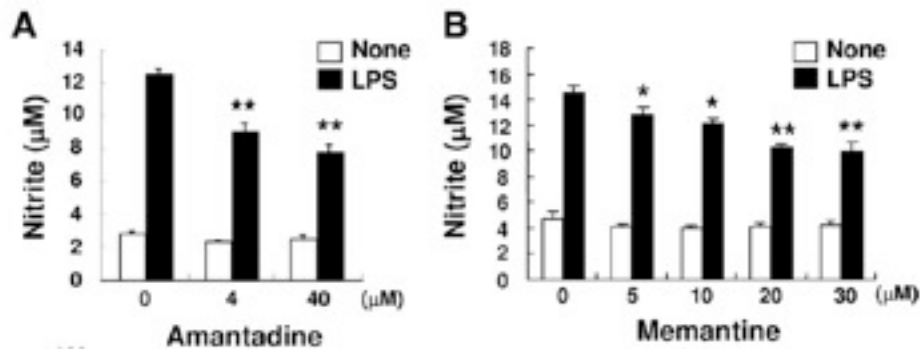
neuronal diminuindo o estresse oxidativo que ocorre ativamente em pacientes esquizofrênicos durante a progressão da patologia através da ativação das células da Glia (Gama et al., 2006; 2008a; 2008b; Kim et al 2012); conseqüentemente diminuindo a morte neuronal por apoptose.

Após a publicação destes artigos e baseado nestas hipóteses anteriores, um grupo de pesquisadores coreanos liderados por Kim iniciou uma série de experimentos para avaliar o efeito da amantadina e memantina na viabilidade, sobrevivência e nível inflamatório de neurônios de ratos expostos a lipopolissacarídeo (LPS), uma poderosa endotoxina bacteriana implicada na fisiopatologia da sepsis em humanos e animais (Kim et al, 2012 in press). As cobaias receberam injeções diárias da endotoxina durante quatro semanas e foram divididas em grupo controle (LPS + Salina), grupo da amantadina (LPS + Amantadina) e grupo da memantina (LPS + Memantina). Os resultados mostram que amantadina e seu derivado, memantina, foram capazes de reverter a cascata inflamatória induzida pela endotoxina e prevenir a morte neuronal, aumentando a sobrevivência das células de forma significativa (Figuras 3, 4, 5, 6). Apesar de ser um ensaio de modelo animal e bioquímico simplório quando comparado a fisiopatologia de doenças neuro-psiquiátricas, o estudo de Kim et al abre caminho para a descoberta de um possível mecanismo de ação adjuvante da amantadina e seus derivados. Este mecanismo também pode elucidar a complexa ação farmacológica do fármaco em pacientes com Esquizofrenia, no momento que surgem cada vez mais evidências de um

importante papel do sistema imune e inflamatório para diátese e evolução desta patologia. (Benjamin, 2011)

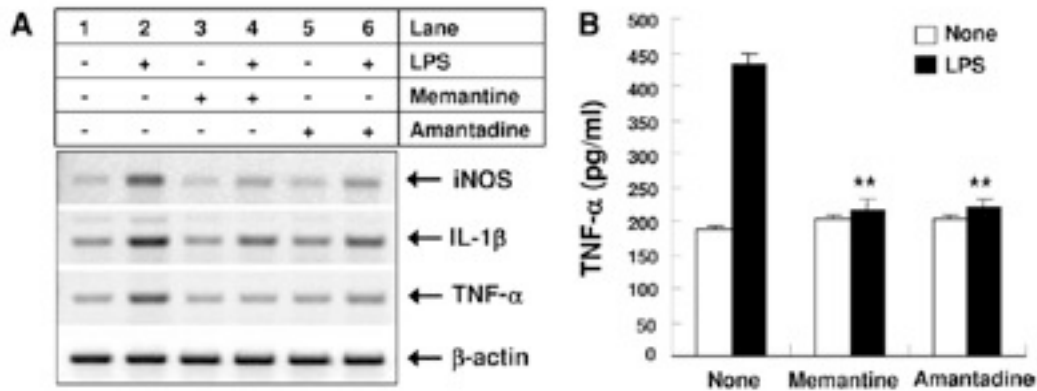
Figura 3.

J.H. Kim et al. / Neurobiology of Aging xx (2011) xxx



Produção de radicais livres de oxido nítrico por neurônios estimulados por LPS. Neste gráfico observamos que os derivados adamantanos foram capazes de diminuir a liberação deste agente neuro-tóxico. (Figuras a seguir gentilmente cedidas por Kim et al, ainda em publicação)

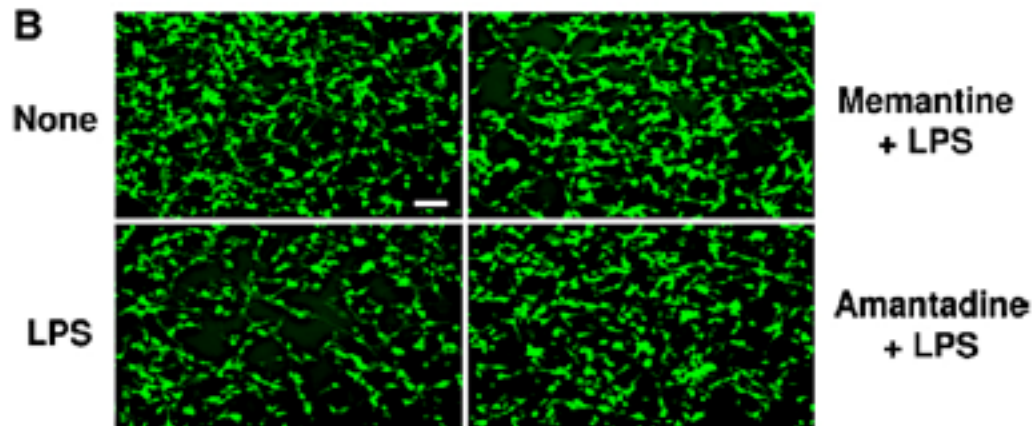
Figura 4.



A. Produção de Fatores inflamatórios (descritos na figura) por neurônios estimulados com LPS, comparados a neurônios estimulados por LPS e tratados com amantadina e memantina.

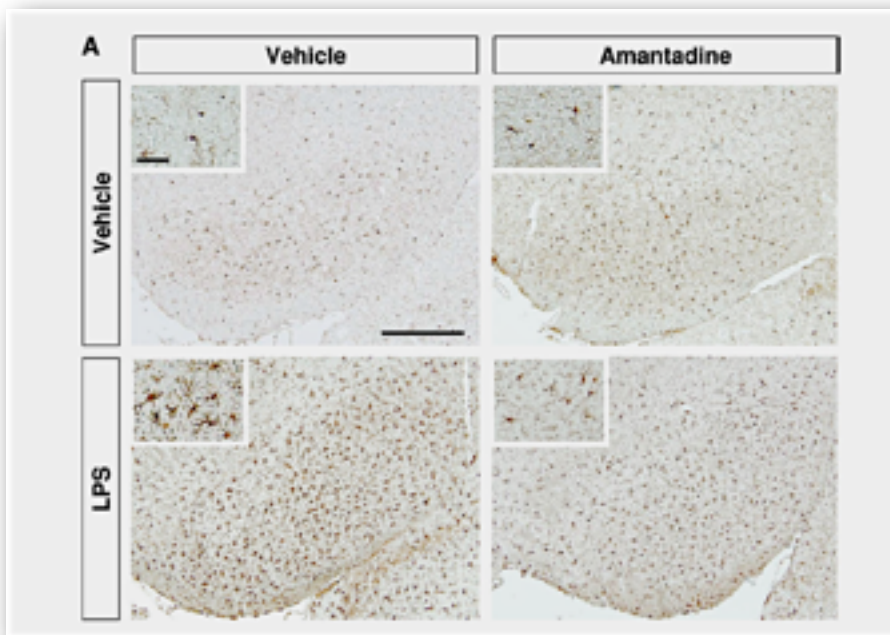
B. Destaque para a produção de Fator de Necrose Tumoral Alfa, reconhecido como agente pró-apoptótico, e controle da sua produção com uso dos derivados adamantanos.

Figura 5.



Morte Neuronal após administração crônica de LPS (Endotoxina Bacteriana). As imagens mostram a cultura de microglias hígdas (superior esquerdo), cultura de microglias após estresse oxidativo decorrente da ação inflamatória de LPS (inferior esquerdo) e a sobrevivência celular, comparável a culturas hígdas quando administrados juntamente LPS e Adamantanos (superior direito e inferior direito).

Figura 6.



Ativação Inflamatória Neuronal em cérebros de ratos com exposição à LPS (nota: quanto maior a ativação inflamatória, maior a captação de corante pelas células). A figura mostra o grau de ativação neuronal e gliose in vivo após administração crônica de LPS. Os grupos tratados com amantadina foram capazes de reverter o processo de gliose e inflamação histológica como pode ser observado na lâmina inferior direita (região dos núcleos da base). Kim et al em publicação.

O mecanismo de ação da amantadina ainda é objeto de estudo contínuo desde a década de setenta. A molécula em concentrações terapêuticas parece causar a liberação maciça de catecolaminas provenientes dos depósitos intraneuronais em um mecanismo de tipo anfetamínico. Também tem sido demonstrado que têm atividade em receptores glutamatérgicos ionotrópicos NMDA e metabotrópicos, que podem contribuir para seu efeito anti-parkinsoniano, além de bloqueio serotoninérgico. (Stoof et al. 1992) Vale ressaltar que amantadina tem seletividade preferencial pelos neurônios cortico-centrais de catecolaminas (Grelak et al 1970; Strömberg et al 1970).

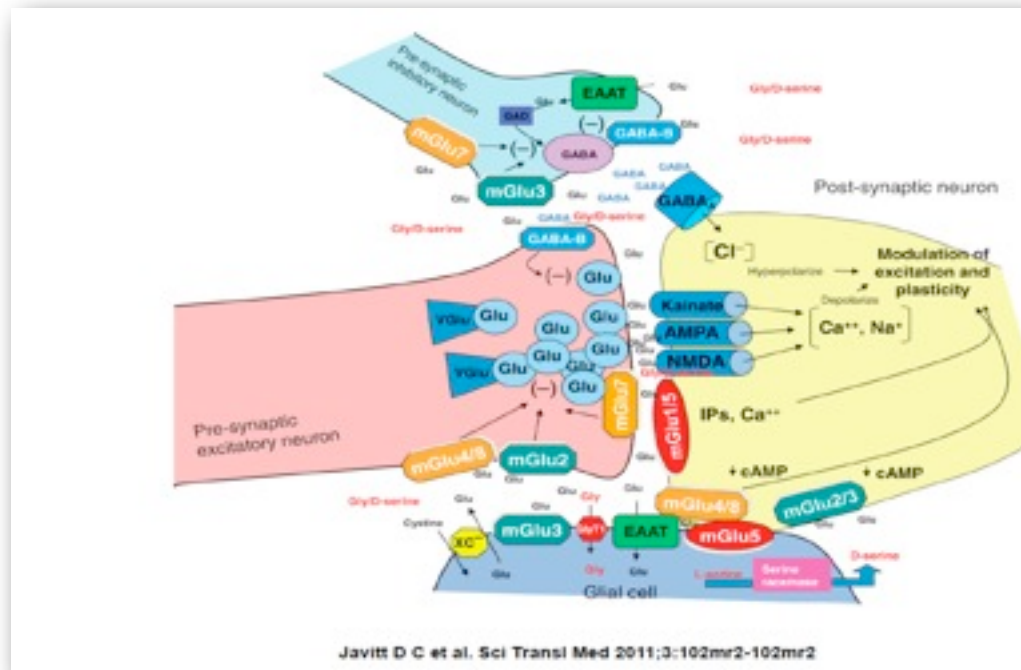
Muitos bloqueadores orgânicos dos canais de NMDA, como a Ketamina (KET) e a Fenilciclidina (PCP) afetam o canal, especificamente o perfil de abertura destes receptores (Johnson e Qian, 2002; Sobolevsky, 2003). No entanto, estudos recentes mostram que esta ocupação do canal de receptores NMDA por bloqueadores tem sido principalmente para estabilizar o estado de **canal aberto**. Amantadina parece ser o primeiro bloqueador do canal de receptor NMDA que tem uma forte tendência cinética a estabilizar os estados de **canal fechado**. Desta forma, amantadina funciona de forma muito semelhante ao efeito fisiológico do Mg^{++} , justificando a sua boa aceitação clínica e perfil terapêutico distinto de outros bloqueadores NMDA, que tendem a piorar ou induzir quadros psicóticos esquizofreniformes. (Kampa et al, 2004, Vargas-Caballero e Robinson, 2004)

Assim, as ações de bloqueio da amantadina e do Mg^{++} podem apresentar duas semelhanças notáveis: uma cinética incomum de desbloqueio rápido e a capacidade de acelerar o fechamento do canal, bloqueando-o em estados patológicos. Pelo exposto, amantadina e sua derivada, memantina, são bloqueadores dos canais NMDA que exibem utilidade clínica elevada. Seus espectros de utilidade, no entanto, diferem substancialmente. (Danysz et al, 1997) Por exemplo, amantadina parece ser mais eficaz em estados parkinsonianos, catatônicos e inflamatórios agudos, enquanto a memantina é uma molécula menos ativadora, menos potente e de ação mais retardada, sendo atualmente a única medicação aprovada pelo FDA no tratamento da doença de Alzheimer moderada a grave (Lipton et al., 2007). Do mesmo modo, cada fármaco apresenta distintas propriedades antagonistas NMDA que influenciam a sua afinidade, cinética, capacidade de permanecer no interior do canal de NMDA e estratégia de uso.

As propriedades da amantadina aqui descritas permitem que a cinética deste fármaco sejam menos dependente da voltagem neuronal inicial, autorizando que ele funcione como um íon de Mg^{++} aprimorado, desbloqueando o receptor de NMDA durante a despolarização breve de um potencial de ação fisiológico, uma característica que pode justificar o uso deste fármaco em estados de injúria cerebral aguda e crônica (traumatismo crânio-encefálico e acidente vascular cerebral), em que existe ativação inflamatória exarcebada e completa desordem do sistema glutamatérgico, com efeitos tóxicos de prognóstico sombrio. (Blandpied et al, 2005)

Nossa observação em estudos anteriores é de que a neurodegeneração é um fato importante e pouco tratado nos pacientes com esquizofrenia, principalmente naqueles com doença refratária. Isto porque a sintomatologia sub-clínica envolve um tônus glutamatérgico anômalo e variável ao longo do cérebro, que seria apenas parcialmente controlado pelas medicações antipsicóticas correntes. (De Lucena, 2009) (Figura 7)

Figura 7.



Fenda sináptica de um neurônio glutamatérgico evidenciando os receptores NMDA, AMPA, Kainato e os Metabotrópicos. Na figura temos os possíveis sítios de ação da amantadina no sistema de glutamato (NMDA, mGLUT3 e mGLUT5) e sua interrelação com outros neurotransmissores. Há forte evidência que o sistema glutamatérgico está alterado nos estados esquizofreniformes, sendo responsável por vários sintomas desta doença. O glutamato, sendo o principal neurotransmissor excitatório cerebral, apresenta importante papel na formação de novas memórias, na cognição e no aprendizado (Danysz et al., 1997; Kornhuber et al., 1994). Está também implicado em algumas doenças neurodegenerativas e traumáticas como Demência de Alzheimer, Demência Parkinsoniana, Acidentes Vasculares Cerebrais, Traumas Cranioencefálicos, Morte Encefálica, Esclerose Múltipla além da própria Esquizofrenia. (Muehlmann et al., 2008; Nishikawa et al., 2008, Gregor et al., 2005) Adaptado de Javitt DC et al.

Corroborando hipóteses citadas anteriormente, existem maiores evidências que a amantadina é igualmente capaz de aumentar o tônus monoaminérgico através do acréscimo de dopamina (Peeters et al., 2002), noradrenalina e serotonina (Page et al., 2000; Fisher et al., 2000; Herblin et al., 1972) em áreas cerebrais chaves (trato córtico-hipocampal, trato órbito-frontal e córtex pré-frontal) para os pacientes esquizofrênicos. Além de modular diretamente a transmissão do peptídeo glutamato através de seu agonismo parcial dos receptores de NMDA, e servir como um agente anti-inflamatório, corrigindo a produção de interleucinas e prostaglandinas, (Kalia et al., 2008; Wieronska et al., 2009).

Por todos estes dados, a amantadina pode ser um potencial neuromodulador e antiinflamatório para esquizofrenia e patologias semelhantes.

4.5 Inflamação e Sistema Glutamatérgico: A Origem dos Sintomas?

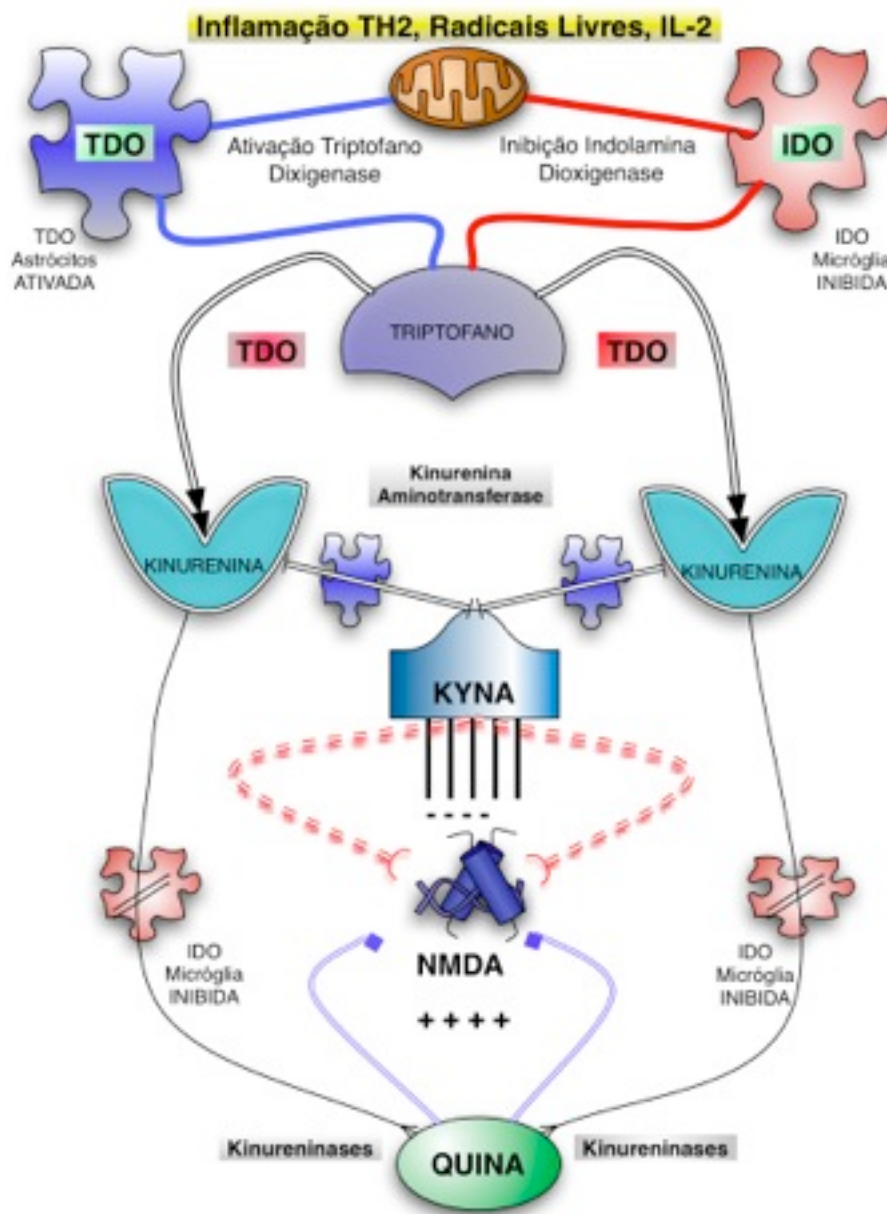
Este tópico pretende de uma forma generalista, destacar os principais achados psiconeuroimunológicos, preenchendo a lacuna sobre a possível etiologia da esquizofrenia, sua fisiopatologia e resultados recentes de estudos farmacológicos e genéticos. Conforme descrito anteriormente a esquizofrenia é um distúrbio da neurotransmissão dopaminérgica, mas a modulação do sistema dopaminérgico pela neurotransmissão glutamatérgica parece desempenhar um papel fundamental do surgimento dos sintomas psicóticos. Esta visão é apoiada por descobertas dos genes neuroregulina e disbindina, que têm um impacto funcional no sistema glutamatérgico. Hipofunção glutamatérgica, no entanto, é mediada pelo antagonismo do receptor N-metil-D-aspartato (NMDA). O antagonista do receptor NMDA por substâncias endógenas é possivelmente a origem da disfunção glutamatérgica, sendo identificado até o presente momento o ácido cinurênico (KYNA) como principal molécula antagonista endógena. Apesar do antagonismo do receptor NMDA, KYNA também bloqueia, em doses mais baixas, o receptor nicotínico, ou seja, aumento dos níveis KYNA pode explicar sintomas psicóticos e deterioração cognitiva. Pesquisas recentes apontam os níveis de KYNA como mais elevados no líquido cefalorraquidiano (LCR) e no sistema nervoso central de pacientes esquizofrênicos, em comparação aos controles. Outra linha de evidência sugere que uma infecção (pré-natal) está envolvida na patogênese da esquizofrenia através da modulação incorreta e fora de controle do ciclo do ácido cinurênico. Devido a um processo

de sensibilização precoce do sistema imunológico ou a uma infecção crônica, ocorreria um desequilíbrio imunológico entre o tipo-1 e o tipo-2 de respostas imunes. O tipo-1 de resposta é parcialmente inibida, enquanto a resposta do tipo-2 é mais ativada. Alterações genéticas do complexo de histocompatibilidade principal dos pacientes com esquizofrenia dão maior suporte a este achado. (Muller et al, 2006)

Esta desregulação imune está associada com a inibição da enzima dioxigenase indoleamina (IDO), porque a enzima IDO - localizada em astrócitos e células da microglia - é inibida por citocinas do tipo-2. IDO catalisa o primeiro passo no metabolismo de triptofano, a degradação do triptofano para cinurenina, assim como outra enzima, a triptofano 2,3-dioxigenase (TDO). Devido à inibição da IDO, a cinurenina é predominantemente metabolizada pela TDO, que está localizado em astrócitos, e não em células da microglia. Na esquizofrenia, os astrócitos em particular são ativados em excesso, como o aumento dos níveis de S100B parecem assinalar com boa evidência. Além disso, os astrócitos não têm o equipamento enzimático para o metabolismo normal da rota de triptofano. Devido à falta de hidroxilase (KYN-OHase) em astrócitos, KYNA acumula-se no SNC, enquanto a via metabólica das células da microglia está bloqueado. Assim, um aumento de atividade da TDO tem sido observada em regiões chaves do SNC de esquizofrênicos. Estes mecanismos resultam em um acúmulo de KYNA em regiões críticas do SNC. Assim, a desregulação imune leva ao surgimento de alterações da modulação glutamatérgica-dopaminérgica que podem resultar no quadro clínico de esquizofrenia. Dessa forma, inibidores deste processo

inflamatório, e moléculas reguladoras das células da glia podem melhorar os sintomas psicóticos (Muller et al 2011). A amantadina tem capacidade de influenciar nestes sistemas. (Ver figura 8 e Anexo 1).

Figura 8.



A figura mostra como a inibição da IDO desloca a cadeia de metabolismo do triptofano para os astrócitos que são incapazes de produzir corretamente o ácido Quinolinico que tem propriedades moduladoras adequadas sobre o receptor NMDA (QUINA). Desta forma, a TDO passa a liderar o metabolismo, acumulando ácido cinurênico que inibirá os receptores NMDA (De Lucena 2012).

4.6 Referências Bibliográficas

Allers KA, Bergstrom DA, Ghazi LJ, Kreiss DS, Walters JR. MK801 and amantadine exert different effects on subthalamic neuronal activity in a rodent model of Parkinson's disease. *Exp Neurol*. 2005 Jan;191(1):104-18.

Areosa SA, Sherriff F, McShane R. Memantine for dementia. *Cochrane Database Syst Rev*. 2005 Jul 20;(3):CD003154.

Altman DG et al. The revised CONSORT statement for reporting randomized trials: explanation and elaboration. *Ann Intern Med* 2001; 134: 663-94.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, fourth Edition. Washington, DC, 1994.

Barch DM, Carter CS. Amphetamine improves cognitive function in medicated individuals with schizophrenia and in healthy volunteers. *Schizophr Res* 2005 1;77:43-58.

Benjamin Pickard (2011). Progress in defining the biological causes of schizophrenia. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 13.

Bressan RA, Pilowsky LS. The Glutamatergic Hypothesis of Schizophrenia. *Rev Bras Psiquiatr* 2003; 25(3):177-183.

Blanpied T.A, Richard J. Clarke, Jon W. Johnson. Amantadine Inhibits NMDA Receptors by Accelerating Channel Closure during Channel Block. *The Journal of Neuroscience*, March 30, 2005 • 25(13):3312–3322

Carlsson A, Lindqvist M, Magnusson T. 3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxytryptophan as reserpine antagonists. *Nature*. 1957;180:1200.

Carlsson A, Lindqvist M. Effect of chlorpromazine or haloperidol on the formation of 3-methoxytyramine and normetanephrine in mouse brain. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)*. 1963;20:140–144.

Carlsson A. The current status of the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 1988;1:179-186.

Coyle JT, Tsai G. The NMDA receptor glycine modulatory site: A therapeutic target for improving cognition and reducing negative symptoms in schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl)* 2004;174:32-38.

Classificação de Transtornos Mentais e de Comportamento da CID-10 - Organização Mundial de Saúde - Editora Artes Médicas Sul, 1992.

Davis BD. *Frontiers of the biological sciences*. Science 1980; 209:78-89.

Davis KL, Kahn RS, Ko G, Davidson M. Dopamine in schizophrenia: a review and reconceptualization. *Am J Psychiatry*. 1991;148:1474–1486.

Davidson LL, Heinrichs RW. Quantification of frontal and temporal lobe brain-imaging findings in schizophrenia: a meta-analysis. *Psychiatry Res*. 2003;122:69–87.

Danysz W, Parsons CG, Kornhuber J, Schmidt WJ, Quack G (1997) Aminoadamantanes as NMDA receptor antagonists and antiparkinsonian agents preclinical studies. *Neurosci Biobehav Rev* 21:455– 468.

Deberdta W, Winokurb A, Cavazzonia PA, Trzaskomaa QN, Carlsona CD, Bymastera FP, Wienerc K, Florisd M, Breier A, Amantadine for weight gain associated with olanzapine treatment *European Neuropsychopharmacology* 15 (2005) 13– 21

Delay J, Deniker P, Harl JM. Therapeutic use in psychiatry of phenothiazine of central elective action (4560 RP). *Ann Med Psychol (Paris)*. 1952;110:112–117.

Fresan A, De la Fuente-Sandoval C, Loyzaga C, Garcia-Anaya M, Meyenberg N, Nicolini H, Apiquian R. A forced five-dimensional factor analysis and concurrent validity of the Positive and Negative Syndrome Scale in Mexican schizophrenic patients. *Schizophr Res* 2005; 72(2-3):123-9.

Fisher A, Starr MS. Opposite effects of glutamate antagonists and antiparkinsonian drugs on the activities of DOPA decarboxylase and 5-HTP decarboxylase in the rat brain. *Brain Res*. 2000 Jun 23;868(2):268-74.

Galvão MGA, Santos MARC, Cunha AJLA Amantadine and rimantadine for influenza A in children and the elderly. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, Issue 2, 2009

Gama CS, Berk M, Andreazza AC, Kapczinski F, Belmonte-de-Abreu P. Serum levels of brain-derived neurotrophic factor and thiobarbituric acid reactive substances in chronically medicated schizophrenic patients: a positive correlation. *Rev Bras Psiquiatr*. 2008a Dec;30(4):337-40.

Gama CS, Salvador M, Andreazza AC, Lobato MI, Berk M, Kapczinski F, Belmonte-de-Abreu PS. Elevated serum thiobarbituric acid reactive substances in clinically symptomatic schizophrenic males. *Neurosci Lett*. 2008b Mar 15;433(3):270-3.

Gama CS, Salvador M, Andreazza AC, Kapczinski F, Silva Belmonte-de-Abreu P. Elevated serum superoxide dismutase and thiobarbituric acid reactive substances in schizophrenia: a study of patients treated with haloperidol or clozapine. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2006 May;30(3):512-5.

Gama, Clarissa Severino, David De Lucena, Cíntia Cruz, Maria Inês Lobato, and Paulo Silva Belmonte-de-Abreu. 2010. "Improvement of schizophrenia negative and positive symptoms with amantadine as add-on therapy to antipsychotics: a case series.." *Revista brasileira de psiquiatria (São Paulo, Brazil : 1999)* 32 (2) (June): 193–194.

Grelak RP, Clark R, Stump JM, et al: Amantadine-dopamine interaction: possible mode of action in parkinsonism. *Science* 169:203–204, 1970

Haring C, Fleischhacker WW, Schett P, Humpel C, Barnas C, Saria A. Influence of patient-related variables on clozapine plasma levels. *Am J Psychiatry* 1990;147:1471-5.

Heresco-Levy U. Glutamatergic neurotransmission modulators as emerging new drugs for schizophrenia. *Expert Opin Emerg Drugs* 2005;10:827-844.

Howes and Shitij Kapur. The Dopamine Hypothesis of Schizophrenia: Version III The Final Common Pathway *Schizophrenia Bulletin* vol. 35 no. 3 pp. 549–562, 2009

Huber TJ, Dietrich DE, Emrich HM: Possible use of amantadine in depression. *Pharmacopsychiatry*, 1999, 32, 47–55.

Javitt DC. Negative schizophrenic symptomatology and the PCP (phencyclidine) model of schizophrenia. *Hillside J Clin Psychiatry* 1987;9:12-35.

Javitt DC, Zukin SR. Recent advances in the phencyclidine model of schizophrenia. *Am J Psychiatry* 1991;148: 1301-1308.

Javitt, Daniel C. 2010. "Glutamatergic theories of schizophrenia.." *The Israel journal of psychiatry and related sciences* 47 (1): 4–16.

Johnson JW, Qian A (2002) Interaction between channel blockers and channel gating of NMDA receptors. *Biologicheskie Membrany* 19:17–22.

Kampa BM, Clements J, Jonas P, Stuart GJ (2004) Kinetics of Mg²⁺ unblock of NMDA receptors: implications for spike-timing dependent synaptic plasticity. *J Physiol (Lond)* 556:337–345.

Karlsgodt, Katherine H, Daqiang Sun, Amy M Jimenez, Evan S Lutkenhoff, Rachael Willhite, Theo G M van Erp, and Tyrone D Cannon. 2008. "Developmental disruptions in neural connectivity in the pathophysiology of schizophrenia.." *Development and psychopathology* 20 (4): 1297–1327. doi: 10.1017/S095457940800062X.

Kapur, Shitij. 2003. "Psychosis as a state of aberrant salience: a framework linking biology, phenomenology, and pharmacology in schizophrenia.." *The American journal of psychiatry* 160 (1) (January): 13–23.

Kay Sr, Fiszbein A, Opler LA. Positive and Negative Scale Symptoms for Schizophrenia. *Schizophr Bull* 1987; 3: 261-276.

Kim J.H., Ho-Won Lee, Jaegyu Hwang, Jaehong Kim, Min-Jeong Lee. Microglia-inhibiting activity of Parkinson's disease drug amantadine. *Neurobiology of Aging* In Press, 2011

Kantrowitz, Joshua T, and Daniel C Javitt. 2010. "N-methyl-d-aspartate (NMDA) receptor dysfunction or dysregulation: The final common pathway on the road to schizophrenia?" *Brain Research Bulletin* 83 (3-4) (September): 108–121. doi: 10.1016/j.brainresbull.2010.04.006.

Krystal JH, Karper LP, Seibyl JP, Freeman GK, Delaney R, Bremner JD, et al. Subanesthetic effects of the noncompetitive NMDA antagonist, ketamine, in humans. Psychotomimetic, perceptual, cognitive, and neuroendocrine responses. *Arch Gen Psychiatry* 1994;51:199-214.

Krystal JH, Perry EB, Jr., Gueorguieva R, Belger A, Madonick SH, Abi-Dargham A, et al. Comparative and interactive human psychopharmacologic effects of ketamine and amphetamine: Implications for glutamatergic and dopaminergic model psychoses and cognitive function. *Arch Gen Psychiatry* 2005;62:985-994.

Krivoy A, Weizman A, Laor L, Hellinger N, Zemishlany Z, Fischel T. Addition of memantine to antipsychotic treatment in schizophrenia inpatients with residual symptoms: A preliminary study. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2008;18(2):117-21

Kornhuber J, Riederer P, Bleich S, Wiltfang J, Kraus T, Meinekel. Pharmacokinetic characterization of amantadine in human brain tissue. *Ther Drug Monit.* 2006 Oct;28(5):693-5.

Kunz M, Gama CS, Andrezza AC, Salvador M, Ceresér KM, Gomes FA, Belmonte-de-Abreu PS, Berk M, Kapczinski F. Elevated serum superoxide dismutase and thiobarbituric acid reactive substances in different phases of

bipolar disorder and in schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2008 Oct 1;32(7):1677-81.

Lameh J, Burstein ES, Taylor E, Weiner DM, Vanover KE, Bonhaus DW. Pharmacology of N-desmethylclozapine. *Pharmacol Ther*. 2007 Aug;115(2):223-31.

Lahti AC, Koffel B, LaPorte D, Tamminga CA. Subanesthetic doses of ketamine stimulate psychosis in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 1995;13:9-19.

Lahti AC, Weiler MA, Tamara Michaelidis BA, Parwani A, Tamminga CA. Effects of ketamine in normal and schizophrenic volunteers. *Neuropsychopharmacology* 2001;25:455-467.

Lauronen E, Koskinen J, Veijola J, Miettunen J, Jones PB, Fenton WS, Isohanni M. Recovery from schizophrenic psychoses within the northern Finland 1966 Birth Cohort. *J Clin Psychiatry* 2005;66(3):375-83.

Lewis, David A, and Robert A Sweet. 2009. "Schizophrenia from a neural circuitry perspective: advancing toward rational pharmacological therapies.." *The Journal of clinical investigation* 119 (4) (April): 706–716. doi:10.1172/JCI37335.

Lieberman JA, Kane JM, Alvir J. Provocative tests with psychostimulant drugs in schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl)*. 1987;91:415–433.

Lipton SA. Paradigm shift in NMDA receptor antagonist drug development: molecular mechanism of uncompetitive inhibition by memantine in the treatment of Alzheimer's disease and other neurologic disorders. *J Alzheimers Dis* 2004; 6(6 Suppl):S61-74.

Lorraine V Kalia, Suneil K Kalia, Michael W Salter, *Lancet Neurol* 2008; 7: 742–55. NMDA receptors in clinical neurology: excitatory times ahead

Lucena D, Fernandes B, Berk M, Dodd S,; Medeiros D, Pedrini M, Kunz M, Gomes F, Giglio L, Lobato MI, Belmonte-de-Abreu PS, GAMA CS. Improvement of schizophrenia negative and positive symptoms: A double-blind, randomized, placebo-controlled trial with memantine as add-on therapy to clozapine. *Journal of Clinical Psychiatry*, 2009.

McNally, J M, R W McCarley, J T McKenna, Y Yanagawa, and R E Brown. 2011. “Complex receptor mediation of acute ketamine application on in vitro gamma oscillations in mouse prefrontal cortex: modeling gamma band oscillation abnormalities in schizophrenia..” *Neuroscience* (October 19). doi:10.1016/j.neuroscience.2011.10.015.

Malhotra AK, Pinals DA, Adler CM, Elman I, Clifton A, Pickar D, et al. Ketamine-induced exacerbation of psychotic symptoms and cognitive impairment in neuroleptic-free schizophrenics. *Neuropsychopharmacology* 1997;17:141-150.

Malhotra AK, Pinals DA, Weingartner H, Sirocco K, Missar CD, Pickar D, et al. NMDA receptor function and human cognition: The effects of ketamine in healthy volunteers. *Neuropsychopharmacology* 1996;14:301-307.

Marder SR, Mintz J, Van Putten T, Lebell M, Wirshing WC, Johnston-Cronk K. Early prediction of relapse in schizophrenia: an application of receiver operating characteristic (ROC) methods. *Psychopharmacol Bull* 1991;27:79-82.

McGuire P, Howes OD, Stone J, Fusar-Poli P. Functional neuroimaging in schizophrenia: diagnosis and drug discovery. *Trends Pharmacol Sci*. 2008;29:91–98.

Moore RY, Whone AL, McGowan S, Brooks DJ. Monoamine neuron innervation of the normal human brain: an 18F-DOPA PET study. *Brain Res.* 2003;982:137–145.

Moghaddam B. Bringing order to the glutamate chaos in schizophrenia. *Neuron* 2003;40:881-884.

Morvanova M, Lakso M, Pirhonen J, Nawa H, Wong G, Castren E: The neuroprotective agent memantine induces brain-derived neurotrophic factor and trkB receptor expression in rat brain. *Mol Cell Neurosci*, 2001, 18, 247–258.

Muehlmann AM, Devine DP. Glutamate-mediated neuroplasticity in an animal model of self-injurious behaviour. *Behav Brain Res.* 2008 May 16;189(1):32-40.

Müller N, Schwarz M. Schizophrenia as an inflammation-mediated dysbalance of glutamatergic neurotransmission. *Neurotox Res.* 2006 Oct.;10(2):131–148.

Müller N, Myint AM, Schwarz MJ. Kynurenine pathway in schizophrenia: pathophysiological and therapeutic aspects. *Curr. Pharm. Des.* 2011;17(2):130–136.

Swerdlow, Neal R. 2011. “Are we studying and treating schizophrenia correctly?” *Schizophrenia Research* 130 (1-3) (August 1): 1–10. doi:10.1016/j.schres.2011.05.004.

Nishikawa, M. Nagai, T. Moritoyo, H. Yabe, M. Nomoto*Parkinsonism and Related Disorders xxx (2008) 1–3 IN PRESS Plasma amantadine concentrations in patients with Parkinson’s disease

Olney JW, Farber NB. Glutamate receptor dysfunction and schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 1995;52:998-1007.

Page G, Peeters M, Maloteaux JM, Hermans E. Increased dopamine uptake in striatal synaptosomes after treatment of rats with amantadine. *Eur J Pharmacol.* 2000 Sep 1;403(1-2):75-80.

PARKER W. BABINGTON, B.A. DAVID R. SPIEGEL, M.D. *Psychosomatics* 2007; 48:534–536. Treatment of Catatonia With Olanzapine and Amantadine.

Parkes JD, Zilkha KJ, Calver DM, et al: Controlled trial of amantadine hydrochloride in Parkinson's disease. *Lancet* 1(7641):259–262, 1970

Parwani A, Weiler MA, Blaxton TA, Warfel D, Hardin M, Frey K, et al. The effects of a subanesthetic dose of ketamine on verbal memory in normal volunteers. *Psychopharmacology (Berl)* 2005;183:265-274.

Pencer A, Addington J, Addington D. Outcome of a first episode of psychosis in adolescence: a 2-year follow-up. *Psychiatry Res* 2005;133(1):35-43.

Peeters M, Page G, Maloteaux JM, Hermans E. Hypersensitivity of dopamine transmission in the rat striatum after treatment with the NMDA receptor antagonist amantadine. *Brain Res.* 2002 Sep 13;949(1-2):32-41.

Rands, GSJ. Memantine as a neuroprotective treatment in schizophrenia. *Br J Psychiatry* Repeated co-treatment with fluoxetine and amantadine induces brain-derived neurotrophic factor gene expression in rats: Zofia Rogó, Grayna Skuza, Beata Legutko *Pharmacological Reports* 2008, 60, 817–826 ISSN 1734-1140.

Rogoz Z, Dziedzicka-Wasylewska M, Daniel WA, et al. Effects of joint administration of imipramine and amantadine in patients with drug-resistant unipolar depression. *Pol J Pharmacol.* 2004;56:735–742

Seeman P, Lee T. Antipsychotic drugs: direct correlation between clinical potency and presynaptic action on dopamine neurons. *Science*. 1975;188:1217–1219.

Seeman P, Lee T, Chau-Wong M, Wong K. Antipsychotic drug doses and neuroleptic/dopamine receptors. *Nature*. 1976;261:717–719.

Simpson GM, Angus JW. A rating scale for extrapyramidal side effects. *Acta Psychiatr Scand* 1970; 212 (suppl):11-14.

Sobolevsky AI, Koshelev SG, Khodorov BI (1998) Interaction of memantine and amantadine with agonist-unbound NMDA-receptor channels in acutely isolated rat hippocampal neurons. *J Physiol (Lond)* 512:47– 60.

Sodré, Leonardo A, Joana Bucker, Karine Zortéa, Mireia F Sulzbach-Vianna, and Clarissa Severino Gama. 2010. "Mania switch induced by amantadine in bipolar disorder: report of three cases." *Revista brasileira de psiquiatria (São Paulo, Brazil : 1999)* 32 (4): 467–469. doi:10.1590/S1516-44462010000400029.

Stys PK, Lipton SA. White matter NMDA receptors: an unexpected new therapeutic target? *Trends Pharmacol Sci*. 2007 Nov;28(11):561-6.

Stoof JC, Booij J, Drukarch B: Amantadine as N-methyl-d-aspartic acid receptor antagonist: new possibilities for therapeutic applications? *Clin Neurol Neurosurg* 94:S4–S6, 1992

Strömberg U, Svensson TH, Waldeck B: On the mode of action of amantadine. *J Pharm Pharmacol* 22:959–962, 1970

Thomas C. Memantine and catatonic schizophrenia. *Am J Psychiatry* 2005;162(3):626.

Tuominen HJ, Tiihonen J, Wahlbeck K. Glutamatergic drugs for schizophrenia: a systematic review and meta-analysis. *Schizophr Res* 2005; 72:225-234.

Tomitaka S, Hashimoto K, Narita N, Minabe Y, Tamura A. Amantadine induces c-fos in rat striatum: reversal with dopamine D1 and NMDA receptor antagonists. *Eur J Pharmacol*. 1995 Oct 16;285(2):207-11.

Vargas-Caballero M, Robinson HP (2003) A slow fraction of Mg²⁺ unblock of NMDA receptors limits their contribution to spike generation in cortical pyramidal neurons. *J Neurophysiol* 89:2778–2783.

Vargas-Caballero M, Robinson HPC (2004) Fast and slow voltage-dependent dynamics of magnesium block in the NMDA receptor: the asymmetric trapping block model. *J Neurosci* 24:6171–6180.

Wenning GK; Working Group on Atypical Parkinsonism of the Austrian Parkinson's Society. Placebo-controlled trial of amantadine in multiple-system atrophy. *Clin Neuropharmacol*. 2005 Sep-Oct;28(5):225-7.

Wieronska JM, Pilc A. Metabotropic glutamate receptors in the tripartite synapse as a target for new psychotropic drugs Authors: PII: S0197-0186(09)00095-3 DOI: doi:10.1016/j.neuint.2009.02.019 Reference: NCI 2400 To appear in: *Neurochemistry International*

Umbricht, Daniel, Liselotte Schmid, Rene Koller, Franz X Vollenweider, Daniel Hell, and Daniel C Javitt. 2000. "Ketamine-Induced Deficits in Auditory and Visual Context-Dependent Processing in Healthy Volunteers: Implications for Models of Cognitive Deficits in Schizophrenia." *Archives of General Psychiatry* 57 (12) (December 1): 1139–1147. doi:10.1001/archpsyc.57.12.1139.

Üstün TB. The global burden of mental disorders. *American Journal of Public Health*, 1999;89(9), 1315-1318.

5. Objetivos

Objetivo Primário

Verificar a viabilidade clínica e farmacológica do uso de amantadina em pacientes com esquizofrenia, bem como em modelo animal desta patologia.

Objetivos Secundários

- Verificar se pacientes com diagnóstico de esquizofrenia e catatonia, apresentam modificação dos sintomas quando a amantadina é usada como monoterapia em altas doses.
- Verificar se ratos em modelo animal esquizofrenia, apresentam modificação dos sintomas positivos e negativos quando a amantadina é usada como monoterapia.
- Verificar se ratos em modelo animal de esquizofrenia, apresentam modificação dos complexos mitocondriais oxidativos.
- Verificar e propor o possível mecanismo de ação da amantadina em uso no modelo animal de esquizofrenia.

5.1 Aspectos Éticos

Todos os pacientes e controles assinaram termo de consentimento informado previamente ao início dos estudos.

Foi assegurada a ausência de vinculação da concordância em participar do estudo com a continuidade do atendimento Ambulatório de esquizofrenia (PRODESQ), no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Ambos os estudos com animais foram aprovados pelos Comitês de Ética em Pesquisa das instituições envolvidas – o Hospital de Clínicas de Porto Alegre

6. Artigos

6.1 Artigo 1 – Inglês

Your Revised Submission

Journal of Clinical Psychopharmacology barbara.kern@tufts.edu via yahoo.com		
to Clarissa Gama		

CC: barbara.kern@tufts.edu

Ref.: Ms. No. JCP-D-11-00211R1

ACUTE TREATMENT OF CATATONIA WITH AMANTADINE IN
SCHIZOPHRENIA AND SCHIZOAFFECTIVE DISORDER: CASE SERIES.

The Journal of Clinical Psychopharmacology

Dear Dr. Gama:

I am pleased to tell you that your Revised manuscript has now been Accepted for publication in the Journal of Clinical Psychopharmacology. Thank you for making the requested revisions and for your thorough cover letter.

Copyright/Disclosure Form: You submitted your signed Copyright Form online, but we NEED the forms for each of the other 4 co-authors. (If they already emailed them to me, please let me know. If not, the Copyright/Author Disclosure Form can be found online at <http://jcp.edmgr.com/>).

A SEPARATE Form must be completed and signed by each Author and returned to the editorial office by email (barbara.kern@tufts.edu), at your convenience.

Signed Copyright Forms for EACH Author must be received by the Editorial Office before your paper can be processed for publication.

You will receive page proofs to check and a reprint order form by email about two months prior to the actual publication date, which we do not know as yet.

All sources of funding/support and relevant disclosures and conflicts of interest for ALL authors must be stated, or indicate "The authors declare no conflicts of interest". [NOTE: This information was not included on your Title Page. We will add this statement, unless we hear from you by email regarding other disclosures.]

Thank you for your contribution to the Journal.

Sincerely,

Barbara Kern, Managing Editor
Journal of Clinical Psychopharmacology
Tufts University School of Medicine
Department of Pharmacology
136 Harrison Avenue
Boston, MA 02111

Email: barbara.kern@tufts.edu

Tel: [617-636-2178](tel:617-636-2178)

Fax: [617-636-6738](tel:617-636-6738)

ACUTE TREATMENT OF CATATONIA WITH AMANTADINE IN SCHIZOPHRENIA AND SCHIZOAFFECTIVE DISORDER

David Freitas de Lucena ^{1,2}, Joel Porfirio Pinto ^{3,4}, Jaime E. Hallak ^{4,5}, José Alexandre Crippa ^{4,5}, Clarissa Severino Gama ^{2,4,*} .

1 Departamento de Psiquiatria Faculdade de Medicina Christus, Fortaleza, Ceará, Brazil

2 Programa de Pós-Graduação em Medicina: Psiquiatria, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

3 Universidade de Fortaleza, Fortaleza, Ceará, Brazil.

4 Laboratory of Molecular Psychiatry and INCT for Translational Medicine, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

5 Department of Neuroscience and Behavioral Science, Medical School, University of São Paulo (USP), Ribeirão Preto (SP), Brazil

*Corresponding Author

Hospital de Clínicas de Porto Alegre - Laboratory of Molecular Psychiatry

Rua Ramiro Barcelos, 2350. Prédio Anexo

90035-903. Porto Alegre, RS. Brazil

E-mail: clarissasgama@gmail.com

Phone: +55 51 33598845

FAX:+55 51 33598846

Catatonia is a common syndrome that was first described by Karl Kahlbaum in 1874 (1) and whose classification, diagnosis, and pathophysiology are still matters of debate in the scientific literature today, posing a challenge to clinicians. There are symptomatic similarities between catatonia and Parkinson's disease with regard to akinesia rigidity, and odd behavior. (1). The most well-established treatment options for catatonia consist of lorazepam and electroconvulsive therapy (ECT) (1,2). Guidelines list these biological treatments as effective in acute and chronic catatonia, but a large number of patients do not respond to them (2). Among patients with co-morbid affective disorders, catatonic signs typically respond dramatically to benzodiazepine therapy. Nevertheless, patients with schizophrenia (SZ) usually have a poor response compared to patients with affective disorders, suggesting different underlying processes causing catatonia in each disorder (3). A recent open-trial for catatonia treatment in patients with psychosis reports that ECT, benzodiazepines, and clozapine had beneficial effects on catatonic features, whereas typical antipsychotics resulted in clinical worsening (4). Contra-indications, family denial and transient response are limitations to the use of lorazepam and ECT (5). Amantadine was introduced for the pharmacological management of neuroleptic malignant syndrome (NMS) because of its beneficial effects in Parkinson's disease which were attributed to dopaminomimetic properties. While the dopaminomimetic effects of amantadine are weak under experimental conditions, it has been reported that amantadine is

an antagonist at the N-methyl-D-aspartate (NMDA) type of the glutamate receptor.(6). It has been increasingly suggested that glutamate dysregulation may be involved in the neuropathology of SZ in general, and in catatonia in particular, mainly through NMDA receptor dysfunction (7,8,9). Successful therapeutic response to the NMDA receptor antagonist amantadine has been reported in SZ and catatonia (10,11,12,13). We evaluated the use of amantadine therapy for four weeks in five cases of acute catatonia in SZ or schizoaffective disorder (SZA).

Clinical response was assessed at baseline (W0), and seven (W1), fourteen (W2), twenty-eight (W4) days, after amantadine initiation, with the 23 - item Bush-Francis Catatonia Rating Scale (BFCRS) (4) and the Simpson-Angus Scale (SAS) for extra-pyramidal side effects (14). The patients included in the study fulfilled a strict definition of catatonia (presence of four or more signs/symptoms, with at least one with a score > 2 in the BFCRS, and no autonomic dysfunction or hyperthermia. The patients' caregivers were informed about the study protocol and ECT was offered as the first option. When the caregivers refused to proceed with ECT, the amantadine protocol was offered. The patients and caregivers provided their signed consent for the experimental use of amantadine with doses increased up to 600mg/day over a period of four weeks. All the patients were medication-free for at least 72h. Antipsychotic medication was reintroduced on the third week of amantadine treatment. Catatonic patients with recent use of depot medication, recent history of depressive symptoms or history of mania/hypomania were excluded.

In all five patients, who were in full episode of catatonic symptoms, amantadine led to considerable reductions in scores in SAS, and BFCRS. The best response was observed between the 10th and the 21th days. Clinical outcome was also improved. Four patients had an excellent response with remission of all catatonic symptoms. One patient had a very good response, but in the 20th he became more psychotic and aggressive, and Risperidone 4mg was added with a good response. Patients characteristics' are summarized in table 1. In the next section detailed descriptions for each case are given.

PATIENT 1

A 42 year old woman showed posturing, mutism, akinesia, staring, rigidity, ecolalia, ecopraxia and autism on admission. Twenty days before, her husband said that she was complaining about “a real movie” that her relatives were doing with hidden cameras in her house, like Big Brother Show. She was very suspicious and stopped to do her housewife duties. This patient needed a nasogastric feeding and IV fluids. On the 5th day of amantadine treatment, she became more alert and started to eat, but still autistic and mute. In the 14th day, we observed reverse of all her catatonic symptoms including mutism, which did not, reappeared later. She was psychotic until the end of the study. She had a good response with clorpromazine 400mg and was discharged with amantadine 400mg add-on.

PATIENT 2

A 21 years old man was admitted. At admission, he claimed to be related with a famous actress in Brazil, demanded to release all internal patients and had a bizarre behavior (eating garbage), slow, posturing, and occasionally mute. He had received bilateral ECT with good response on one prior admission, but his mother was denying ECT this time because it was “burning his brain and worsening the disease”. While waiting for familiar consent for ECT, the patient became mute, posturing, and displayed waxy flexibility on day 2 of his admission. He initiated the amantadine protocol and in the 10th he was almost recovered from those symptoms. In the 20th the patient became much more aggressive, restless and active, with excess of sexual arouse and megalomaniac thought. In the 21th catatonic symptoms were fully recovered. He was discharged with haloperidol 10mg, lithium 1200mg and amantadine 200mg a day.

PATIENT 3

A 45 year old woman was admitted showing akinesia, mutism, rigidity, staring, catalepsy, posturing, negativism, and autism. The family did not authorize ECT. This patient needed nasogastric feedind. Amantadine was started 72h after hospitalization. At the end of protocol, patient had a good and notable improvements: she talked currently, cried during the family visiting, eat meals by herself and had no posturing, wax flexibility, akinesia or staring. Patient stayed with mild negative and cognitive symptoms. She was discharged with olanzapine 10mg and amantadine 400mg a day.

PATIENT 4

A 20 year old man was brought to the hospital by some friends, who found him confused, paranoid, sometimes bizarre/disoriented, and screaming for his mother. He had echolalia and echopraxia. In the next day patients was staring, in mutism, and waxy flexibility. Family did not authorize ECT. Amantadine protocol was initiated and the patient had an excellent response with full recover on 8th day. He was able to talk about his experience and said: "I was afraid to talk or move my muscles because someone was controlling me". He was discharged with zuclopentixol 20mg/day.

PATIENT 5

A 36 years old woman was admitted. Her behavior was completely bizarre as she was eating her on fezzes. She became with akinesia, mutism, rigidity, staring along several hours. Amantadine protocol was initiated and the patient had an excellent response with full recover in the 20th day. Her behavior was more acceptable, but she had auditory hallucinations. Risperidone 6mg/day has started and patient was discharged after 45 days of hospitalization with risperidone 6mg and amantadine 400mg a day with no catatonic or positive symptoms.

Patient	Age (years)	Illness duration (years)	Sex	DSM-IV diagnosis	Medications at third week of amantadine treatment (mg/day)	Nasogastric feeding at baseline	SAS				BFCRS			
							W0	W1	W2	W4	W0	W1	W2	W4
1	42	1	Female	SZ	Chlorpromazine (400)	Yes	20	8	3	5	32	20	10	4
2	21	7	Male	SZA	Haloperidol (10), lithium (1200)	No	12	5	1	1	31	25	5	5
3	45	1	Female	SZ	Olanzapine (10)	Yes	24	15	9	7	44	25	15	10
4	20	2	Male	SZ	Zuclopentixol (20)	No	8	0	0	0	47	10	4	1
5	36	12	Female	SZ	Risperidone (6)	No	12	12	4	0	38	9	11	4

Table 1 – Patients with acute catatonia and DSM-IV schizophrenia (SZ) or schizoaffective disorder (SZA) treated with amantadine

SAS: Simpson-Angus Scale for extra-pyramidal side effects; BFCRS: 23-item Bush-Francis Catatonia Rating Scale
W0: baseline; W1: week 1; W2: week 2; W3: week 3; W4: week 4

Discussion

We report the therapeutic efficacy of amantadine in five patients with SZ and SZA disorder and acute catatonia. Some lines of evidence suggest that amantadine is efficient to treat the negative and cognitive symptoms of SZ (9,11). Amantadine increases the monoaminergic tonus through increased release of dopamine, noradrenaline, and serotonin in the amygdala and hippocampus (15). Amantadine and its analogue, memantine, act by modulating the glutamate tonus through partial agonism of NMDA receptors and have an important role on

cognition, learning, and recent memory recall. Memantine and amantadine stabilize the neuronal membrane by reducing oxidative stress in patients with SZ (16), and increase the cerebral availability of Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) reducing neuronal death by apoptosis (15,17).

Catatonia is known to be a heterogeneous syndrome, more frequently observed in association with affective disorders, particularly major depression. When associated with affective disorders, catatonia responds better to available treatments, mainly ECT (6). However, catatonic patients with SZ do not promptly respond to lorazepam or ECT as reported (18). Most of these patients also have high scores in negative symptoms scales and cognitive impairment that persist after catatonia remission (19).

Our results are in line with the hypothesis that glutamatergic and dopaminergic homeostasis in brain areas including prefrontal, thalamic, limbic and cerebrocerebellar regions mediated by partial activation of NMDA receptors would be responsible for the improvement of negative and catatonic symptoms; and are also consistent with previous findings from our group and others that amantadine and memantine have therapeutic effects in SZ (7,8,9, 10,11,12,13).

Symptomatic similarities between catatonia and Parkinson's disease with regard to akinesia, rigidity, and odd behavior suggest that glutamatergic hyperfunction occurs in the projections from the nucleus subthalamicus to the globus pallidus internus, and from the thalamus to cortical pathways (12). Moreover, Parkinson's disease and catatonia also share striatal and fronto-cortical dopaminergic hypofunction (4,12).

In respect to the molecular mechanism of action, amantadine and memantine seem to act by counteracting dysfunctional neurotransmission associated with catatonia, although we are still unable to name the precise pathways where this occurs. Literature suggests that therapeutically relevant concentrations of amantadine may be more active in the striatum, whereas memantine is likely to be more active in non-striatal structures. This would explain the better clinical profile of amantadine as compared to memantine in Parkinson's disease and catatonic SZ (19,20).

Amantadine appears to be a unique, non-selective drug that acts in different brain areas and pathways, consisting of a promising pharmacological option for the treatment of catatonic SZ. However, double-blind controlled trials are warranted to confirm these observations.

References

1. Fink M, Taylor MA. The catatonia syndrome: forgotten but not gone. *Archives of general psychiatry* 2009;66(11):1173-7.
2. Bush G, Fink M, Petrides G et al. Catatonia. Treatment with lorazepam and electroconvulsive therapy. *Acta psychiatrica Scandinavica* 1996;93(2):137-43.
3. Rosebush PI, Mazurek MF. Catatonia and its treatment. *Schizophrenia bulletin* 2010;36(2):239-42.
4. England ML, Ongür D, Konopaske GT et al. Catatonia in psychotic patients: clinical features and treatment response. *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences* 2011;23(2):223-6.

5. Zisselman MH, Jaffe RL. ECT in the treatment of a patient with catatonia: consent and complications. *American journal of psychiatry* 2010;167(2): 127-32.
6. Kornhuber J, Weller M. Amantadine and the glutamate hypothesis of schizophrenia. Experiences in the treatment of neuroleptic malignant syndrome. *Journal of Neural Transmission. General Section* 1993;92(1): 57-65.
7. Weder ND, Muralee S, Penland H, Tampi et al. Catatonia: a review. *Annals of clinical psychiatry* 2008; 20(2):97-107.
8. Lucena D De, Fernandes BS, Berk M et al. Improvement of negative and positive symptoms in treatment-refractory schizophrenia: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial with memantine as add-on therapy to clozapine. *Journal of clinical psychiatry*. 2009;70(10):1416-23.
9. Gama CS, Lucena D De, Cruz C et al. Improvement of schizophrenia negative and positive symptoms with amantadine as add-on therapy to antipsychotics: a case series. *Revista brasileira de psiquiatria* 2010;32(2):193-4.
10. Muneoka K, Shirayama Y, Kon K et al. Improvement of mutism in a catatonic schizophrenia case by add-on treatment with amantadine. *Pharmacopsychiatry* 2010;43(4):151-2.
11. Carpenter SS, Hatchett AD, Fuller MA. Catatonic schizophrenia and the use of memantine. *The Annals of Pharmacotherapy* 2006;40(2):344-6.

12. Kornhuber J, Weller M. Amantadine and the glutamate hypothesis of schizophrenia. Experiences in the treatment of neuroleptic malignant syndrome. *Journal of neural transmission* 1993;92(1):57-65.
13. Northoff G, Eckert J, Fritze J. Glutamatergic dysfunction in catatonia? Successful treatment of three acute akinetic catatonic patients with the NMDA antagonist amantadine. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 1997;62(4):404-6.
14. Simpson GM, Angus JW. A rating scale for extrapyramidal side effects. *Acta psychiatrica scandinavica* 1970;212:11-9.
15. Peeters M, Page G, Maloteaux JM, Hermans E. Hypersensitivity of dopamine transmission in the rat striatum after treatment with the NMDA receptor antagonist amantadine. *Brain Research* 2002;949(1-2):32.
16. Gama CS, Berk M, Andreazza AC et al. Serum levels of brain-derived neurotrophic factor and thiobarbituric acid reactive substances in chronically medicated schizophrenic patients: a positive correlation. *Revista Brasileira de Psiquiatria* 2008;30(4):337-40.
17. Morvanova M, Lakso M, Pirhonen J et al. The neuroprotective agent memantine induces brain-derived neurotrophic factor and trkB receptor expression in rat brain. *Molecular and Cellular Neuroscience* 2001;18: 247–258.
18. Carroll BT. Kahlbaum's catatonia revisited. *Psychiatry and clinical neurosciences* 2001;55(5):431-6.

19. Kirkhart R, Ahuja N, Lee JW et al. The detection and measurement of catatonia. *Psychiatry* 2007;4(9):52-6.
20. Danysz W, Parsons CG, Kornhuber J et al. Aminoadamantanes as NMDA receptor antagonists and antiparkinsonian agents--preclinical studies. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 1997;21(4):455-68.

Artigo 1 - Português

ACUTE TREATMENT OF CATATONIA WITH AMANTADINE IN SCHIZOPHRENIA AND SCHIZOAFFECTIVE DISORDER

David Freitas de Lucena ^{1,2}, Joel Porfirio Pinto ^{3,4}, Jaime E. Hallak ^{4,5}, José Alexandre Crippa ^{4,5}, Clarissa Severino Gama ^{2,4,*}.

1 Departamento de Psiquiatria Faculdade de Medicina Christus, Fortaleza, Ceará, Brazil

2 Programa de Pós-Graduação em Medicina: Psiquiatria, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

3 Universidade de Fortaleza, Fortaleza, Ceará, Brazil.

4 Laboratory of Molecular Psychiatry and INCT for Translational Medicine, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

5 Department of Neuroscience and Behavioral Science, Medical School, University of São Paulo (USP), Ribeirão Preto (SP), Brazil

*Corresponding Author

Hospital de Clínicas de Porto Alegre - Laboratory of Molecular Psychiatry

Rua Ramiro Barcelos, 2350. Prédio Anexo

90035-903. Porto Alegre, RS. Brazil

E-mail: clarissasgama@gmail.com

Phone: +55 51 33598845

FAX: +55 51 33598846

Catatonía é uma síndrome correntemente diagnosticada que foi primeiramente descrita por Karl Kahlbaum em 1874 (1) e cuja classificação, diagnóstico e fisiopatologia ainda são assuntos de debate na literatura científica de hoje, o que representa um desafio para os clínicos. Há semelhanças entre a catatonía e o quadro sintomático da doença de Parkinson em relação à rigidez acinesia e comportamento estranho. (1). A maioria das opções de tratamento bem estabelecido para catatonía consistem em lorazepam e eletroconvulsoterapia (ECT) (1,2). Diretrizes recomendam o uso destes tratamentos biológicos como eficazes em catatonía aguda e crônica, mas um grande número de pacientes não respondem a eles (2). Entre os pacientes com diagnósticos de transtornos afetivos, os sinais catatônicos normalmente respondem dramaticamente à terapia com benzodiazepínicos. No entanto, pacientes com esquizofrenia (SZ), normalmente têm uma resposta fraca em comparação aos pacientes com transtornos afetivos, sugerindo diferentes processos subjacentes que causam catatonía em cada desordem (3). Um recente estudo aberto para o tratamento de catatonía em pacientes com psicose crônica relatou que a ECT, benzodiazepínicos e clozapina tiveram efeitos benéficos sobre as características catatônicas, enquanto que os antipsicóticos típicos resultaram em piora clínica (4). Contra-indicações para este tipo de tratamento são a negação da família e resposta passageira, o que constitui limitações para o uso de lorazepam e ECT (5). Amantadina foi introduzida para o tratamento farmacológico da síndrome neuroléptica maligna (SNM) por causa de seus efeitos benéficos na doença de Parkinson, que foram atribuídos às propriedades dopaminérgicas. Embora os

efeitos da amantadina em receptores dopaminérgicos sejam fracos em condições experimentais, tem sido relatado que a amantadina é um antagonista do receptor N-metil-D-aspartato tipo (NMDA) de glutamato. (6). Novas evidências mostram cada vez mais que a desregulação do tonus de glutamato está envolvido na neurofisiopatologia da SZ em geral, e na catatonia, em particular, principalmente através de disfunção no receptor NMDA (7,8,9). Resposta terapêutica bem sucedida para uso da amantadina tem sido relatada em SZ e catatonia em diversos estudos correntes (10,11,12,13). Devido todos estes dados prévios, nos avaliamos o uso da terapia com amantadina por quatro semanas em cinco casos de catatonia aguda em SZ ou transtorno esquizoafetivo (SZA).

A resposta clínica foi avaliada no início do estudo (W0), e sete (W1), quatorze (W2), 28 (W4) dias, após o início da amantadina, com a 23 - item Bush-Francis Catatonia Rating Scale (BFCRS) (4) e a Escala de Simpson-Angus (SAS) para efeitos extra-piramidais (14). Os pacientes incluídos no estudo cumpriram uma definição estrita de catatonia (presença de quatro ou mais sinais / sintomas, com pelo menos um com uma pontuação > 2 no BFCRS, e nenhuma disfunção autonômica ou hipertermia. Cuidadores dos pacientes foram informados sobre o protocolo do estudo e ECT foi oferecido como primeira opção. Quando os cuidadores se recusaram a prosseguir com a ECT, o protocolo de amantadina foi oferecido. Os pacientes e cuidadores foram claramente instruídos sobre o estudo e foi colhido consentimento assinado para o uso experimental da amantadina com doses aumentadas até 600mg/dia ao longo de um período de

quatro semanas. Todos os pacientes foram deixados sem medicação por pelo menos 72h. A medicação antipsicótica foi reintroduzida na terceira semana de tratamento com amantadina. Pacientes catatônicos com uso recente de medicação depot, história recente de sintomas depressivos ou história de mania / hipomania foram excluídos.

Em todos os cinco pacientes, que estavam em episódio completo com sintomas catatônicos, amantadina levou a reduções consideráveis nos escores na SAS, e BFCRS. A melhor resposta foi observada entre o décimo e vigésimo primeiro dia. O quadro clínico também foi melhorado. Quatro pacientes tiveram uma resposta excelente, com remissão de todos os sintomas catatônicos. Um paciente teve uma resposta muito boa, mas no 20 dia ele se tornou mais psicótico e agressivo, e risperidona 4 mg foi adicionada com uma boa resposta. Pacientes e características são resumidas na tabela 1. Na próxima sessão descrições detalhadas para cada caso são dadas.

PACIENTE 1

Uma mulher de 42 anos mostrou postura fixa, mutismo, acinesia, olhar com rigidez, ecolalia, ecopraxia e autismo na admissão. Vinte dias antes, seu marido disse que ela estava reclamando de "um filme real" de que seus parentes estavam fazendo com câmeras escondidas na casa dela, como o Big Brother. Ela era muito desconfiada e parou de fazer seus deveres de dona de casa. Este paciente precisou de uma alimentação por sonda nasogástrica e fluidos IV. No dia 5 de tratamento amantadina, ela tornou-se mais alerta e começou a comer,

mas ainda permaneceu autista e muda. No dia 14, observou-se inversão de todos os seus sintomas catatônicos incluindo mutismo, que não reapareceu mais tarde. Ela permaneceu em estado psicótico até o final do estudo. Paciente teve uma boa resposta com 400mg de clorpromazina e recebeu alta com amantadina 400mg add-on.

PACIENTE 2

Um homem de 21 anos foi admitido. No momento da internação, ele alegou estar se relacionando com uma atriz famosa no Brasil, exigiu para liberar todos os pacientes internos e teve um comportamento bizarro (comer lixo), caminhar lento, postura rígida, e, ocasionalmente ficava mudo. Ele havia recebido ECT bilateral com boa resposta em uma admissão prévia, mas sua mãe estava proibindo ECT desta vez, porque iria "queimar seu cérebro e ocasionar agravamento da doença". Enquanto esperava por consentimento familiar para a ECT, o paciente tornou-se mudo, com postura imóvel, flexibilidade cética, quadro exibido no dia 2 de sua admissão. Ele iniciou o protocolo amantadina e no 10 dia ele estava quase recuperado dos sintomas. No 20 o paciente se tornou muito mais agressivo, inquieto e ativo, com excesso de pensamento sexual, insônia e comportamento megalomaniaco. No dia 21, os sintomas catatônicos foram totalmente recuperados. Ele recebeu alta com haloperidol 10 mg, 1200 mg de lítio e amantadina 200mg por dia.

PACIENTE 3

Uma mulher de 45 anos foi internada apresentando acinesia, mutismo, rigidez, catalepsia, postura fixa, negativismo e autismo. A família não autorizou ECT. Este paciente precisou de alimentação nasogástrica. Amantadina foi iniciado 72h após a internação. No final do protocolo, o paciente teve uma melhora boa e notável: ela falou no momento da consulta, chorou durante a visita da família, era capaz de comer refeições sozinha e não tinha postura, flexibilidade cérea, acinesia ou olhar fixo. Paciente permaneceu com leve sintomas negativos e cognitivos. Recebeu alta com olanzapina 10mg e Amantadina 400mg

PACIENTE 4

Um homem de 20 anos de idade foi levado ao hospital por alguns amigos, que o acharam confuso, paranóico, às vezes bizarro / desorientado, e gritando por sua mãe. Ele tinha ecolalia e ecopraxia durante a admissão. No dia seguinte, o mesmo paciente estava olhando fixamente para o teto, em mutismo e flexibilidade cérea. Família não autorizou a ECT. Amantadina em protocolo foi iniciado e o paciente teve uma resposta excelente, com recuperação completa no dia 8. Ele foi capaz de falar sobre sua experiência e disse: "Eu tinha medo de falar ou mover meus músculos, porque alguém estava me controlando". Ele recebeu alta com zuclopentixol 20mg/dia.

PACIENTE 5

Uma mulher de 36 anos foi internada. Seu comportamento era completamente bizarro e sem propósito. Ela intercalava comentários com acinesia, mutismo,

rigidez, olhando fixamente ao longo de várias horas. Amantadina em protocolo foi iniciado e a paciente teve uma resposta excelente, com recuperação completa no dia 20. Seu comportamento era mais aceitável, mas ela seguia com alucinações auditivas. Risperidona 6mg/dia foi acrescentado e paciente recebeu alta hospitalar após 45 dias de internação com risperidona 6mg e amantadina 400mg por dia sem sintomas catatônicos ou positivos.

Patient	Age (years)	Illness duration (years)	Sex	DSM-IV diagnosis	Medications at third week of amantadine treatment (mg/day)	Nasogastric feeding at baseline	SAS				BFCRS			
							W0	W1	W2	W4	W0	W1	W2	W4
1	42	1	Female	SZ	Chlorpromazine (400)	Yes	20	8	3	5	32	20	10	4
2	21	7	Male	SZA	Haloperidol (10), lithium (1200)	No	12	5	1	1	31	25	5	5
3	45	1	Female	SZ	Olanzapine (10)	Yes	24	15	9	7	44	25	15	10
4	20	2	Male	SZ	Zuclopentixol (20)	No	8	0	0	0	47	10	4	1
5	36	12	Female	SZ	Risperidone (6)	No	12	12	4	0	38	9	11	4

Table 1 – Patients with acute catatonia and DSM-IV schizophrenia (SZ) or schizoaffective disorder (SZA) treated with amantadine

SAS: Simpson-Angus Scale for extra-pyramidal side effects; BFCRS: 23-item Bush-Francis Catatonia Rating Scale
W0: baseline; W1: week 1; W2: week 2; W3: week 3; W4: week 4

Discussão

Relatamos a eficácia terapêutica da amantadina em cinco pacientes com SZ ou SZA e catatonia. Algumas linhas de evidência sugerem que a amantadina é eficiente para tratar os sintomas negativos e cognitivos da SZ (9,11). Amantadina aumenta o tônus monoaminérgico através de aumento da liberação de dopamina, noradrenalina e serotonina na amígdala e hipocampo (15). Amantadina e seu análogo, a memantina, atuam também modificando as vias de glutamato através de agonismo parcial dos receptores NMDA e têm um papel importante na cognição, aprendizagem e recuperação da memória recente. Memantina e amantadina estabilizam a membrana neuronal, reduzindo o estresse oxidativo em pacientes com SZ (16), e aumentam a disponibilidade cerebral BDNF, reduzindo a morte neuronal por apoptose (15,17).

Catatonia é conhecido por ser uma síndrome heterogênea, mais freqüentemente observada em associação com transtornos afetivos, principalmente depressão maior e transtorno bipolar. Quando associados com transtornos afetivos, catatonia responde melhor aos tratamentos disponíveis, principalmente ECT (6). No entanto, pacientes catatônicos com SZ não responder prontamente ao lorazepam ou ECT como relatado (18). A maioria destes pacientes também têm altas pontuações nas escalas de sintomas negativos e disfunção cognitiva, que persistem após a remissão catatonia (19).

Nossos resultados estão em linha com a hipótese de que a homeostase do sistema glutamatérgico e dopaminérgico em áreas do cérebro, incluindo o

cortex pré-frontal, tálamo, regiões límbicas e vias cerebelares mediada pela ativação dos receptores NMDA de forma parcial seria responsável pela melhora dos sintomas negativos e catatônicos, e também são consistentes com resultados anteriores de nosso grupo e outros que a amantadina e memantina têm efeitos terapêuticos em SZ (7,8,9, 10,11,12,13).

Semelhanças sintomáticas entre catatonia e doença de Parkinson em relação a acinesia, rigidez e comportamento estranho podem sugerir que uma hiperfunção glutamatérgica ocorre nas projeções do núcleo sub-talâmico para o globo pálido interno, e do tálamo para vias corticais (12) Além disso, a doença de Parkinson e catatonia também compartilham hipofunção dopaminérgica estriatal e fronto-cortical (4,12).

No que diz respeito ao mecanismo molecular de ação, amantadina e memantina parecem agir por contraregular a neurotransmissão disfuncional associado com a catatonia, embora ainda não fomos capazes de nomear os caminhos precisos onde isso ocorre. A literatura sugere que as concentrações terapêuticamente relevantes da amantadina podem ser mais ativas no estriato, enquanto que a memantina é provável que seja mais ativa nas estruturas não estriatais. Isto explicaria o melhor perfil clínico da amantadina, em comparação com memantina na doença de Parkinson e SZ catatônica (19,20).

Amantadina parece ser uma molécula com propriedades únicas, capaz de atuar em diferentes áreas cerebrais, constituído de uma opção promissora para o tratamento farmacológico da catatonia na SZ. No entanto, estudos duplo-cegos controlados são necessários para confirmar estas observações.

References

1. Fink M, Taylor MA. The catatonia syndrome: forgotten but not gone. Archives of general psychiatry 2009;66(11):1173-7.
2. Bush G, Fink M, Petrides G et al. Catatonia. Treatment with lorazepam and electroconvulsive therapy. Acta psychiatrica Scandinavica 1996;93(2):137-43.
3. Rosebush PI, Mazurek MF. Catatonia and its treatment. Schizophrenia bulletin 2010;36(2):239-42.
4. England ML, Ongür D, Konopaske GT et al. Catatonia in psychotic patients: clinical features and treatment response. The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences 2011;23(2):223-6.
5. Zisselman MH, Jaffe RL. ECT in the treatment of a patient with catatonia: consent and complications. American journal of psychiatry 2010;167(2):127-32.
6. Kornhuber J, Weller M. Amantadine and the glutamate hypothesis of schizophrenia. Experiences in the treatment of neuroleptic malignant syndrome. Journal of Neural Transmission. General Section 1993;92(1):57-65.
7. Weder ND, Muralee S, Penland H, Tampi et al. Catatonia: a review. Annals of clinical psychiatry 2008; 20(2):97-107.

8. Lucena D De, Fernandes BS, Berk M et al. Improvement of negative and positive symptoms in treatment-refractory schizophrenia: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial with memantine as add-on therapy to clozapine. *Journal of clinical psychiatry*. 2009;70(10):1416-23.
9. Gama CS, Lucena D De, Cruz C et al. Improvement of schizophrenia negative and positive symptoms with amantadine as add-on therapy to antipsychotics: a case series. *Revista brasileira de psiquiatria* 2010;32(2):193-4.
10. Muneoka K, Shirayama Y, Kon K et al. Improvement of mutism in a catatonic schizophrenia case by add-on treatment with amantadine. *Pharmacopsychiatry* 2010;43(4):151-2.
11. Carpenter SS, Hatchett AD, Fuller MA. Catatonic schizophrenia and the use of memantine. *The Annals of Pharmacotherapy* 2006;40(2):344-6.
12. Kornhuber J, Weller M. Amantadine and the glutamate hypothesis of schizophrenia. Experiences in the treatment of neuroleptic malignant syndrome. *Journal of neural transmission* 1993;92(1):57-65.
13. Northoff G, Eckert J, Fritze J. Glutamatergic dysfunction in catatonia? Successful treatment of three acute akinetic catatonic patients with the NMDA antagonist amantadine. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 1997;62(4):404-6.
14. Simpson GM, Angus JW. A rating scale for extrapyramidal side effects. *Acta psychiatrica scandinavica* 1970;212:11-9.

15. Peeters M, Page G, Maloteaux JM, Hermans E. Hypersensitivity of dopamine transmission in the rat striatum after treatment with the NMDA receptor antagonist amantadine. *Brain Research* 2002;949(1-2):32.
16. Gama CS, Berk M, Andreazza AC et al. Serum levels of brain-derived neurotrophic factor and thiobarbituric acid reactive substances in chronically medicated schizophrenic patients: a positive correlation. *Revista Brasileira de Psiquiatria* 2008;30(4):337-40.
17. Morvanova M, Lakso M, Pirhonen J et al. The neuroprotective agent memantine induces brain-derived neurotrophic factor and trkB receptor expression in rat brain. *Molecular and Cellular Neuroscience* 2001;18: 247–258.
18. Carroll BT. Kahlbaum's catatonia revisited. *Psychiatry and clinical neurosciences* 2001;55(5):431-6.
19. Kirkhart R, Ahuja N, Lee JW et al. The detection and measurement of catatonia. *Psychiatry* 2007;4(9):52-6.
20. Danysz W, Parsons CG, Kornhuber J et al. Aminoadamantanes as NMDA receptor antagonists and antiparkinsonian agents--preclinical studies. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 1997;21(4):455-68.

6.3 Artigo 2 - Inglês

EFFECTS OF AMANTADINE ON BEHAVIOR, RESPIRATORY CHAIN ENZYMES AND CREATINE KINASE IN AN ANIMAL MODEL OF SCHIZOPHRENIA

David F. de Lucena, Gabriel R Fries, Camila Lersch, Leila Canever, Renata de Luca, Giseli Daiane Bez, Isabela Casagrande Jeremias, Emilio L Streck, Alexandra L Zugno, Clarissa S Gama

Introduction

Schizophrenia is a highly debilitating psychiatric disorder with an estimated prevalence of approximately 1-1.5% [Stefan et al., 2002]. Its presentation includes positive symptoms (hallucinations and delusions), negative symptoms (social withdrawal, affective flattening, avolition and blunted affect) and cognitive impairments [Bowie and Harvey 2006]. Treatment of schizophrenic patients includes acute and maintenance management, including a wide range of typical and atypical antipsychotics whose efficacy is not generalized among patients [Jones & Buckley, 2006]. Effective maintenance treatment can decrease the frequency and the severity of the illness episodes, reduce its morbidity and mortality, and maximize the psychosocial functioning and the quality of life of patients [Jones & Buckley, 2006]. Nevertheless, several patients are refractory to medication, and some of the symptoms persists even when the adherence is

considered good [Lindenmayer 2000]. In this sense, further studies are warranted in the search for novel and more effective drugs for the maintenance treatment of schizophrenia.

Despite several studies attempting to search the neurobiological underpinnings of schizophrenia, its pathophysiology is not completely understood. It seems to include a wide range of mechanisms, from genetic markers to oxidative stress [Ross et al., 2006; Bray et al., 2010; Bitanirwe et al., 2011]. Neuroanatomical findings report a decrease in whole brain and grey matter volume [Haren et al., 2011; Cahn et al., 2002; DeLisi et al., 2004; Lieberman et al., 2001], as well as a progressive increase in ventricular and cortical cerebrospinal fluid volumes in first-episode schizophrenic patients [Cahn et al., 2002; DeLisi et al., 2004; Ho et al., 2003; Lieberman et al., 2001]. Taken together, these findings suggest the occurrence of neuronal death in patients.

Among possible mechanisms leading to neuronal damage, disturbs in brain energy metabolism have been reported as important factors [Beal, 1992]. Impaired energy metabolism can lead to neuronal death by decreasing ATP levels and ultimately leading to apoptosis [Kaur et al., 2007]. Of note, mitochondrial dysfunction with subsequent alterations in respiratory chain complexes has been implied in the pathophysiology of schizophrenia [Clay et al., 2011; Ben-Shachar, 2002]. Energy metabolism parameters include the assessment of mitochondrial respiratory chain enzymes and creatine kinase (CK) activity, which participate in energy homeostasis and indicate the level of ATP demand in a sample.

Given the complexity of the disorder and the need for further understanding its neurobiology, different animal models of schizophrenia have been employed [Geyer and Moghaddam, 2002]. In rats and monkeys, noncompetitive NMDA antagonists, including phencyclidine and ketamine (KET), produce a range of behavioral abnormalities that resemble schizophrenia symptoms in humans [Allen and Young, 1978; Becker et al., 2004]. Treatment with KET has been shown to cause individual psychoses in remitted schizophrenic patients [Lahti et al., 1995a; Lahti et al., 1995b; Lahti et al., 2001], and the use of this substance is also used to assess positive and negative symptoms in healthy volunteers [Newcomer et al., 1999]. We and others have used a chronic treatment with subanesthetic doses of KET in rats as an animal model of schizophrenia [de Oliveira et al., 2011; Canever et al., 2010; Bubeníková-Valesová et al., 2008; Becker et al., 2004]. In this model, KET has been shown to induce stereotypic movements and significant social deficits in different treatment schemes [Canever et al., 2010; Bubeníková-Valesová et al., 2008; Lipska and Weinberger, 2000]. Altogether, this model has been shown to present predictive, construct and face validity [de Oliveira et al., 2009; Becker and Grecksch, 2004; Becker et al., 2003], and allows for its use in testing novel potential drugs for schizophrenia.

Among newly tested drugs, memantine, a weak non-selective NMDA receptor antagonist, has been reported to improve cognition and positive and negative symptoms on a randomized placebo-controlled clinical trial as adjunctive to clozapine for treatment-refractory patients with schizophrenia [de

Lucena et al., 2009]. More recently, amantadine (AMA), a memantine's derivate, has improved clinical response to negative symptoms in a case series [Gama et al., 2010], and was effective in the treatment of five patients with schizophrenia, schizoaffective disorder (SZA) and acute catatonia [de Lucena et al., 2011]. AMA may act like memantine by chronically reducing neuronal oxidative stress of treated patients, thus decreasing aggression to neurons and neuronal death.

Based on previous findings, AMA may be a promising drug to be further tested in schizophrenia. A better understanding of its mechanism of action in preclinical studies may point to relevant targets in schizophrenia and the proposal of novel potential drugs for its treatment. To that end, we evaluated the efficacy of AMA in preventing the effects of KET on behavior, mitochondrial respiratory chain and CK activity in an animal model of schizophrenia.

Materials and methods

This study was approved by our local ethics committee and performed in accordance with the recommendations of NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento (SBNeC).

Animals

Adult male Wistar rats (weight 250-300 g) were obtained from our breeding colony (Central Animal House of Universidade do Extremo Sul Catarinense) and caged in groups of five with food and water available *ad libitum*. They were maintained on a 12-h light/dark cycle (lights on at 7:00 am), at a temperature of 22°C ± 1°C.

Treatment

AMA was administered ip at 10 mg/kg for 10 days, followed by 7 days of subanesthetic ip administrations of 25 mg/kg KET (Hunt et al., 2006; de Oliveira et al., 2011). Saline (SAL) injections were performed as controls for both AMA and KET, totalizing four experimental groups: SAL+SAL, SAL+KET, AMA+SAL, and AMA+KET. Thirty minutes after the last injection, rats were placed in an open-field apparatus and evaluated as described below.

Behavioral evaluation

Open-field task

Locomotor activity was assessed in a 50 x 25 x 50 cm open-field surrounded by walls made of brown plywood with a frontal glass wall. The floor of the arena was divided into 12 equal rectangles by black lines. The animals were gently placed on the left rear rectangle and were allowed to explore the arena for 5 minutes. Number of crossings, rearings and grooming were counted.

Stereotypy

Stereotypy was defined as rapid, repetitive head and forelimb movements. This parameter was analyzed at the same time and place as the locomotor activity. Stereotypy is considered by the software as an instable movement any time when repetitive movements are recorded in sequel readings, without

alteration in animals's mass center. The possible units of measurement to be considered are mm (millimeters), cm (centimeters) and in (inches).

Tissue and homogenate preparation

Animals were killed by decapitation 60 min after the behavioral analyses. Brain were removed and hippocampus, prefrontal cortex, striatum and amygdala were homogenized (1:10, w/v) in SETH buffer, pH 7.4 (250 mM sucrose, 2 mM EDTA, 10 mM Trizma base, 50 IU/ml heparin). Homogenates were centrifuged at 800 x g for 10 minutes and the supernatants were kept at -70°C until they were used for enzyme activity determination.

Creatine kinase activity assay

Creatine kinase activity was measured in brain homogenates pre-treated with 0.625 μ M lauryl maltoside. The reaction mixture consisted of 60 μ M Tris-HCl, pH 7.5, containing 7 μ M phosphocreatine, 9 mM $MgSO_4$ and approximately 0.4-1.2 mg protein in a final volume of 100 μ L. After 15 min of pre-incubation at 37°C, the reaction was started by the addition of 0.3 mmol of ADP plus 0.08 μ mol of reduced glutathione. The reaction was stopped after 10 min by the addition of 1 μ mol of p-hydroxymercuribenzoic acid. The creatine formed was estimated according to the colorimetric method of Hughes et al (1962). The color was developed by the addition of 100 μ L 2% μ -naphthol and 100 μ L 0.05% diacetyl in a final volume of 1 μ L and read spectrophotometrically after 20 min at 540 nm. Results were expressed as units (min x mg protein)⁻¹.

Respiratory chain enzyme activity

Complex I, or NADH dehydrogenase, was evaluated using the method described by Cassina and Radi (1996) by the rate of NADH-dependent ferricyanide reduction at 420 nm. Complex II activity was determined by the method described by Fischer and colleagues (1985), and it was measured by following the decrease in absorbance due to the reduction of 2,6-DCIP at 600 nm. Complex I-III activity was measured as cytochrome c reduction from succinate at 550 nm and 37°C according to the method of Birch-Machin and colleagues (1994). The activity of cytochrome c oxidase (complex IV) was assayed according to the method described by Rustin and colleagues (1994), in which the decrease in absorbance due to the oxidation of previously reduced cytochrome c at 550 nm is followed. The activity of the mitochondrial respiratory chain complexes were calculated as nmol/min.mg protein.

Protein content

Protein content was determined by the method described by Lowry and colleagues (1951) using bovine serum albumin as a standard.

Statistical analysis

Data were analyzed using the software SPSS 18 (Statistical Package for the Social Sciences). Number of crossings and rearings, grooming, creatine kinase activity, and the activity of the respiratory chain complexes were all fitted

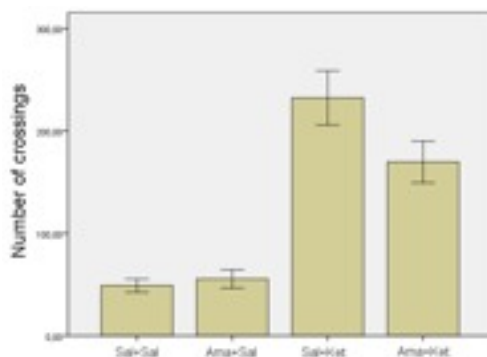
to a standard curve distribution, and were therefore subjected to parametric analyses. Groups were compared by one-way ANOVA, followed by post-test of Tukey. P-values < 0.05 were considered statistically significant. Stereotypy data were not fitted into a standard curve distribution, and were analyzed by Kruskal-Wallis test, followed by Mann-Whitney comparisons between groups. After Bonferroni corrections, P-values < 0.0125 were considered statistically significant.

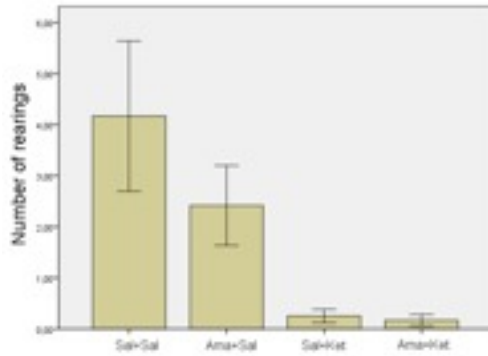
Results

Open-field task

KET significantly increased the number of crossings ($F(3, 44) = 26.089, p < 0.001$) when compared to the control group. This increase was not prevented by AMA on the AMA+KET group ($p < 0.001$), even though there seemed to be a tendency to decrease this parameter ($p = 0.07, \text{SAL+KET vs. AMA+KET}$).

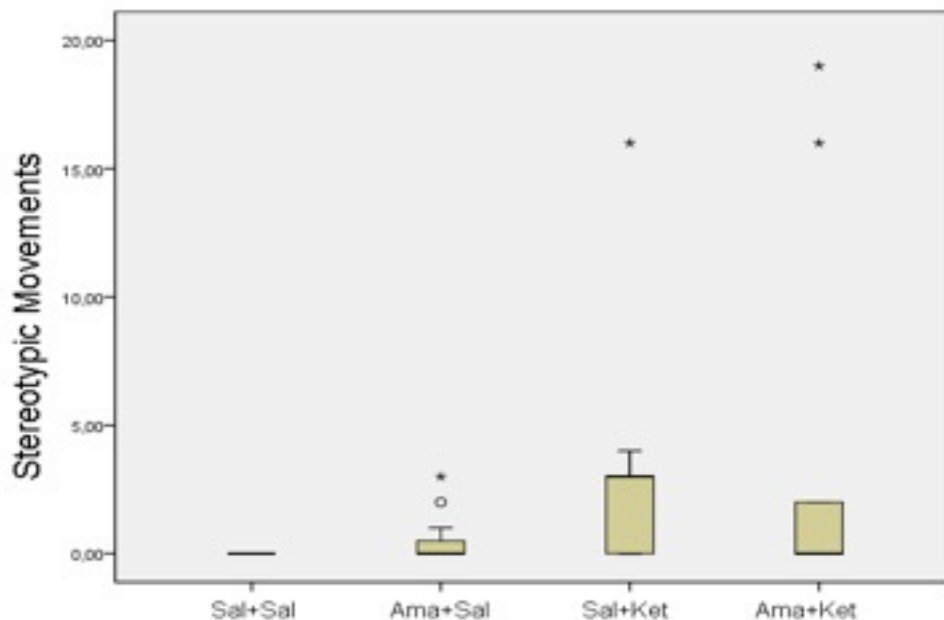
The number of rearings was significantly decreased in SAL+KET and AMA+KET groups ($F(3, 44) = 5.245, p = 0.004$), when compared to the control groups. AMA *per se* induced no changes in the number of crossings or rearings.





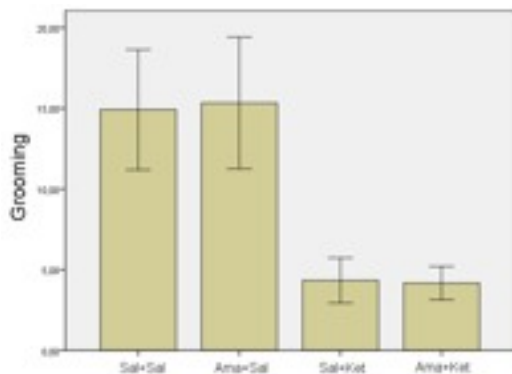
Stereotypic movements

Stereotypy was significantly altered in relation to treatment ($H(3) = 13.601$, $p = 0.04$). KET significantly increased stereotypic movements when compared to control ($U = 24$, $Z = -3.323$, $p = 0.001$), and AMA treatment partially prevented this behavior, since AMA+KET did not significantly differ from the control group ($U = 42$, $Z = -2.44$, $p = 0.015$) or from SAL+KET ($U = 58$, $Z = -0.965$, $p = 0.335$).



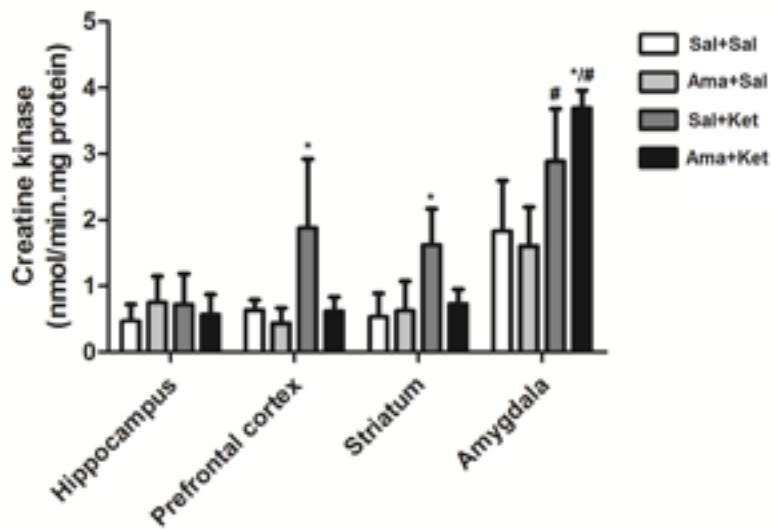
Grooming

Grooming was significantly reduced in SAL+KET and AMA+KET groups when compared to control ($F(3, 44) = 4.701, p = 0.006$). No difference was found between SAL+KET and AMA+KET.



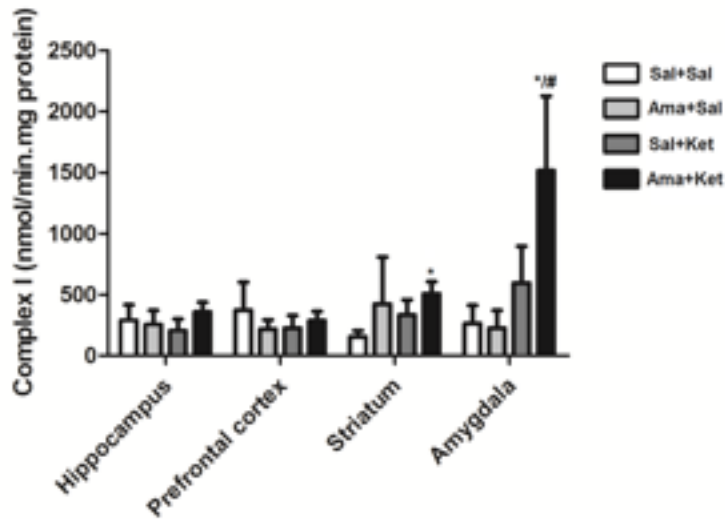
Creatine kinase activity

Treatment with KET increased CK activity in the prefrontal cortex ($F(3, 18) = 8.253, p = 0.001$), striatum ($F(3, 19) = 8.251, p = 0.001$) and amygdala ($F(3, 17) = 10.983, p < 0.001$). This increase was prevented by AMA in prefrontal cortex and striatum, but not in the amygdala ($p = 0.323$, when compared to SAL+KET). In hippocampus, no differences could be found between groups. AMA treatment *per se* did not alter CK activity when compared to control.



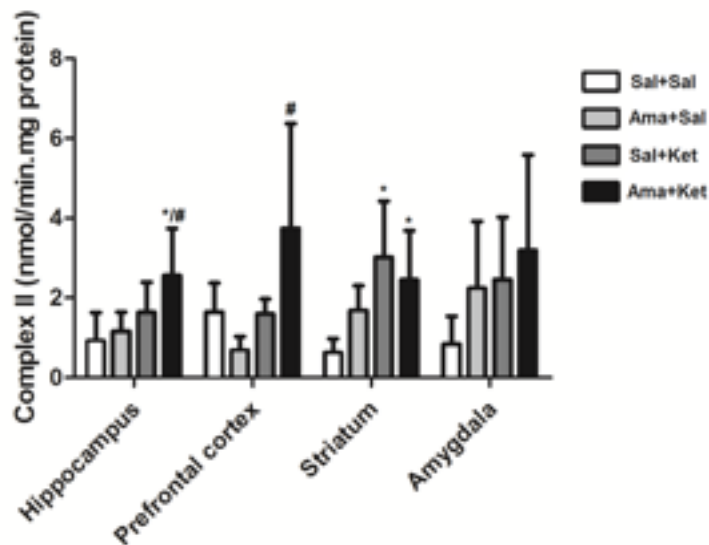
Complex I

KET treatment *per se* did not alter complex I activity. However, when combined to AMA, it increased the enzyme activity in the striatum ($F(22, 3) = 2.948, p = 0.045$) and in the amygdala ($F(3, 15) = 13.995, p < 0.001$). No further differences were found between groups in the hippocampus or in the prefrontal cortex.



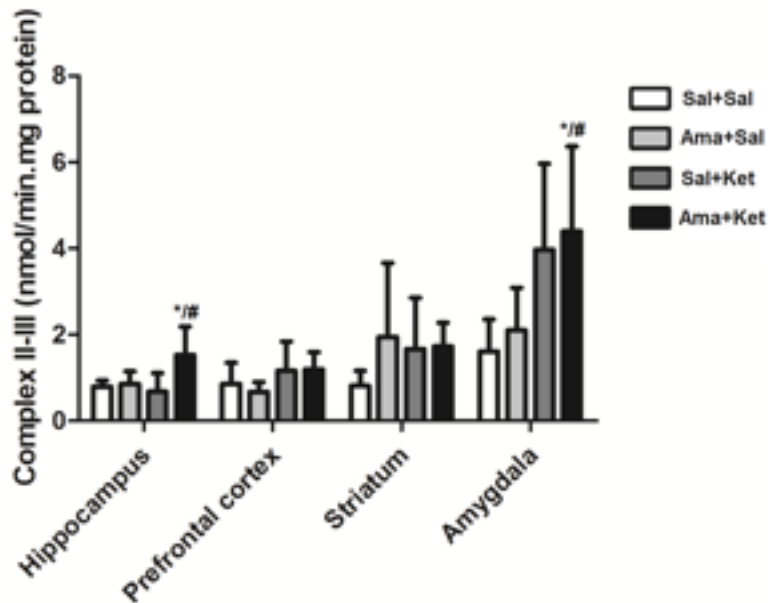
Complex II

KET treatment increased the activity of complex II in the striatum ($F(3, 21) = 7.153, p = 0.002$), whereas the combination of AMA+KET increased this activity in hippocampus ($F(3, 23) = 5.171, p = 0.007$), prefrontal cortex ($F(3, 18) = 5.041, p = 0.01$), and striatum ($F(3, 21) = 7.153, p = 0.002$). No differences were found between groups in the amygdala.



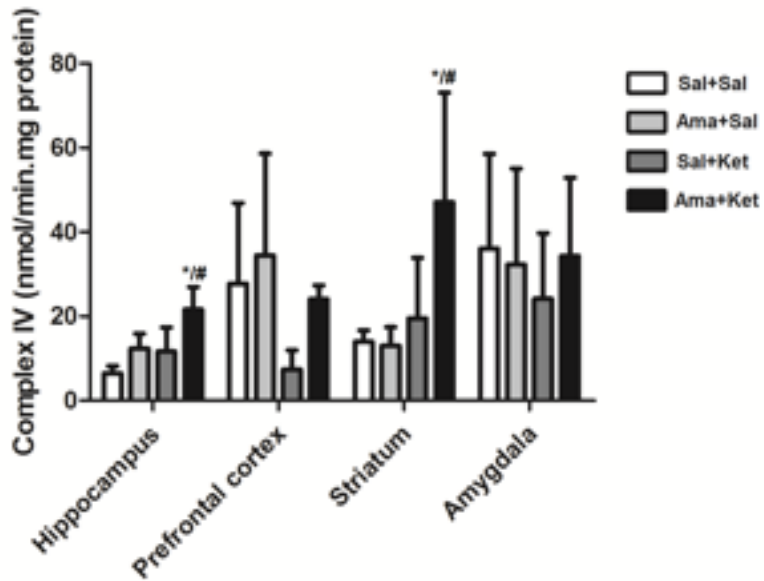
Complex I-III

Whereas KET alone did not change complex I-III activity in any of the brain regions, AMA+KET increased its activity in the hippocampus ($F(3, 22) = 5.166, p = 0.007$) and in the amygdala ($F(3, 18) = 5.54, p = 0.07$). No differences were found between groups in the prefrontal cortex and in the striatum.



Complex IV

AMA+KET treatment increased complex IV activity in the hippocampus ($F(3, 16) = 8.31, p = 0.001$) and in the striatum ($F(3, 14) = 5.087, p = 0.014$), whereas KET treatment *per se* had no effect on the enzyme activity. No differences between groups were found in the prefrontal cortex and in the amygdala.



Discussion

Among several newly tested drugs for schizophrenia, nonselective NMDA antagonists appear to have an important potential for its successful treatment. In an animal model of schizophrenia induced by KET treatment, AMA partially prevented the KET-induced stereotypy as well as the increase in CK activity in prefrontal cortex and in striatum. However, AMA did not prevent KET-induced increase in complex II activity, and acted in a synergic way with KET to increase the activities of other respiratory chain enzymes in different brain regions. In summary, these results suggest that AMA is not fully effective in preventing KET effects, and indicate a synergic action of both drugs in the modulation of respiratory chain enzymes activities.

Sub-anesthetic KET administrations have been consistently employed as a valid animal model of schizophrenia. Given its function as a NMDA antagonist,

it can produce hallucinations and paranoia in humans [Malhotra et al., 1997], which are similar to positive symptoms characteristic of schizophrenic patients. As discussed elsewhere, this model reproduces both positive and negative symptoms of the disorder, as well as its cognitive impairments [Hunt et al., 2006, Littlewood et al., 2006; Takeyama et al., 2006], which makes it suitable to test potential new drugs for the treatment of schizophrenia. Of note, KET effects include changes in dopaminergic, glutamatergic and serotonergic systems, which ultimately lead to increased hippocampal D2 receptors, decreased glutamatergic receptors in the PFC, and increased density of dopamine and serotonin transporters in hippocampus, striatum and PFC [Becker, 2003]. Each of these effects may differentially influence KET-induced behavioral features, and may be responsible for the modulation of mitochondrial functions, as previously shown [de Oliveira et al., 2011].

Behavioral testing showed that KET significantly increased the number of crossings assessed by the open-field test, as well as reduced grooming behavior. These KET-induced features have also been reported in other studies [de Oliveira et al., 2011; Canever et al., 2010], and suggest a relevant face validity for this animal model. However, our results show that AMA could not prevent these behavioral effects, which could suggest a lack of predictive validity for this model. KET also significantly increased stereotypic movements, which was partially prevented by AMA. Clinical data points to an efficacy of memantine and amantadine in improving positive and negative symptoms in refractory schizophrenic patients stabilized with clozapine for at least 10 years [de Lucena

et al., 2009, 2011], which suggests that the effects of AMA might be more related to reversal of symptoms in an adjunctive treatment with neuroleptics, rather than prevention (maintenance treatment), as assessed in our study.

There are also some clinical data showing that memantine and amantadine acts in very unique and instable way in the glutamatergic, dopaminergic and serotonergic pathway, and their use in monotherapy in patients with neuropsychiatric disorders such as schizophrenia, Parkinson disease, bipolar disorders could indeed worsen some psychotic symptoms. On the other hand, AMA appears to act via several pharmacological mechanisms, none of them being identified as the chief mode of action. Moreover, AMA exhibits dopaminergic, noradrenergic and serotonergic activities, blocks monoamine oxidase A and NMDA receptors, and probably elevates β -endorphin/ β -lipotropin levels [De Lucena,2011]. It is still not clear which of these mechanisms are relevant at the therapeutic dose of the drug. All these actions may be crucial for its properties, hence, it has been suggested that AMA is likely to act as an antidepressant and antioxidant through not one, but several mechanisms thought to be related to antidepressant activity

The major clinical studies with positive impact in these psychotic diseases appears when memantine and amantadine are used combined with neuroleptics. Ergo, we need more studies to evaluate the efficacy of NMDA antagonist in adjuvant treatment in the ketamine model of schizophrenia. (Canan, 2010; Seeman, 2007; Fusar-Poli, 2007, Huey, 2005 and Riederer, 1991)

Moreover, KET treatment mimics mostly the acute phase of the disease, and it is possible that AMA may be more efficient in treatment chronic schizophrenia. Further studies are warranted evaluating the efficacy of AMA in reversing KET-induced behavioral effects.

The lack of efficacy of AMA in preventing KET effects could also be seen in the respiratory chain complexes, where in most cases the alteration was found only in the combined AMA+KET group, and not in rats treated only with KET. Interestingly, there seems to be a synergic effect of both drugs in all of the enzymes. This might be explained by the fact that both drugs are NMDA antagonists, and it is possible that this effect might be an important modulator of the respiratory chain enzyme activities assessed in this model. Of note, AMA present other mechanisms of action that account for its neuroprotective effects, which include inhibition of the release of microglial pro-inflammatory factors like TNF Alpha, interleucines , an increase in the expression of neurotrophic factors such as GDNF from astroglia and BDNF among others [Ossola et a., 2011]. In fact, it has been reported that the AMA-induced NMDA receptor inhibition is independent for its neuroprotective effects [Ossola et a., 2011]. These data emphasizing other AMA mechanisms of action justify its use in preventing KET-induced effects, even though they are both NMDA antagonists, and awaits further experiments to clarify the relevance of those different effects on its efficacy for the treatment of schizophrenia.

Mitochondria dysfunction has been reported as a major patophysiological aspect of schizophrenia [Clay et al., 2011; Ben-Shachar and Laifenfeld, 2004;

Ben-Shachar, 2002]. Briefly, it includes mitochondrial hypoplasia, altered mitochondrial-related gene expression, and impairment of the oxidative phosphorylation system in patients [Karry et al., 2004]. Moreover, abnormal mitochondrial morphology, proportion and density have already been found in the brain of schizophrenic individuals [Ben-Shachar, 2002]. Likewise, mitochondrial dysfunction has been investigated after KET administration to rats [de Oliveira et al., 2011]. A previous study from our group has shown that KET treatment *per se* not only increases complex I activity in the striatum, hippocampus and in PFC, but also increases complex I-II activity in the striatum, and also complex IV activity in the hippocampus and striatum [de Oliveira et al., 2011]. However, our results showed no such differences between groups. We found a synergic effect of KET+AMA in increasing complex I activity in the amygdala and striatum, as well as complex II and IV in the hippocampus and in the striatum, and complex I-III in the hippocampus and in the amygdala. Treatment of KET *per se* only increased complex II activity in striatum, which was not seen in our previous study [de Oliveira et al., 2011]. In general, the enhanced activity of mitochondrial respiratory chain complexes found in our samples may reflect an increased supply of energetic demand of cellular functions on these situations.

Such an increased energetic demand is also reflected by our CK results. CK reversibly catalyzes the conversion of creatine and consumes ATP to create phosphocreatine and ADP, thus acting to maintain energy homeostasis. Our results showing increased CK activity in PFC, striatum and amygdala are in accordance with previous studies [Canever et al., 2010], and suggests a higher

ATP demand on these tissues. Moreover, AMA successfully prevented this increase in PFC and striatum, not presenting this effect on amygdala. It is possible that this AMA-induced prevention in CK activity may be associated with the prevention of stereotypic movements, but so far we cannot rule out other possible mechanisms by which it could interfere on KET effects.

Some limitations need to be taken into account when analyzing our data. First of all, even though KET treatment has been successfully employed as an animal model of schizophrenia, it presents obvious limitations when considering the complexity of the disorder and the simplicity of mimicking it with a NMDA antagonist administration. Nonetheless, such a limitation is common to almost every animal model there is, and warrants further research on the development of novel and more reliable animal models of human disorders. Moreover, the efficacy of AMA on preventing schizophrenic-like behaviors would be better assessed in other animal models of schizophrenia, rather than in one induced by a NMDA antagonist. In this case, we considered that other mechanisms of action from KET and AMA are crucial for their effects, thus justifying their combined use in this study.

In summary, we showed that AMA prevented KET-induced stereotypic movements and the increase of CK activity, whereas it had no effect on the locomotor activity and on the activity of mitochondrial chain complexes. Based on clinical data pointing to an efficacy of AMA in treating patients, our results suggest that other animal models of schizophrenia should be employed in the study of AMA as a potential therapeutic drug for this disorder.

References

Allen and Young, 1978 R.M Allen and S.J Young, Phencyclidine-induced psychosis. *Am. J. Psychiatry*, 135 (1978), pp. 1081–1084.

Beal MF. Does impairment of energy metabolism result in excitotoxic neuronal death in neurodegenerative illnesses? *Ann Neurol*. 1992 Feb;31(2):119-30.

Becker A, Grecksch G. Ketamine-induced changes in rat behaviour: a possible animal model of schizophrenia. Test of predictive validity. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2004 Dec;28(8):1267-77.

Becker A, Peters B, Schroeder H, Mann T, Huether G, Grecksch G. Ketamine-induced changes in rat behaviour: A possible animal model of schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2003 Jun;27(4):687-700.

Ben-Shachar D, Laifenfeld D. Mitochondria, synaptic plasticity, and schizophrenia. *Int Rev Neurobiol*. 2004;59:273-96.

Ben-Shachar D. Mitochondrial dysfunction in schizophrenia: a possible linkage to dopamine. *J Neurochem*. 2002 Dec;83(6):1241-51.

Ben-Shachar D. The interplay between mitochondrial complex I, dopamine and Sp1 in schizophrenia. *J Neural Transm*. 2009 Nov;116(11):1383-96.

Birch-Machin MA et al (1994) An evaluation of the measurement of the activities of complexes I-IV in the respiratory chain of human skeletal muscle mitochondria. *Biochem Med Metab Biol* 51:35-42.

Bitanhirwe BK, Woo TU. Oxidative stress in schizophrenia: an integrated approach. *Neurosci Biobehav Rev*. 2011 Jan;35(3):878-93.

Bray NJ, Leweke FM, Kapur S, Meyer-Lindenberg A. The neurobiology of schizophrenia: new leads and avenues for treatment. *Curr Opin Neurobiol*. 2010 Dec;20(6):810-5.

Bubeníková-Valesová V, Horáček J, Vrajová M, Höschl C. Models of schizophrenia in humans and animals based on inhibition of NMDA receptors. *Neurosci Biobehav Rev*. 2008 Jul;32(5):1014-23.

Cahn W, Hulshoff Pol HE, Lems EB, van Haren NE, Schnack HG, Van Der Linden JA, et al. (2002) Brain volume changes in first-episode schizophrenia: a 1-year follow-up study. *Arch Gen Psychiatry* 59: 1002–1010.

Canever L, Oliveira L, D'Altoé de Luca R, Correa PT, de B Fraga D, Matos MP, Scaini G, Quevedo J, Streck EL, Zugno AI. A rodent model of schizophrenia reveals increase in creatine kinase activity with associated behavior changes. *Oxid Med Cell Longev*. 2010; 3(6):421-7.

Cassina A, Radi R (1996) Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. *Arch Biochem Biophys* 328:309-316.

Canan, F., & Ataoglu, A. (2010). Memantine-related psychotic symptoms in a patient with bipolar disorder *The Journal of clinical psychiatry*, 71(7), 957. doi: 10.4088/JCP.09I05802gry

Clay HB, Sullivan S, Konradi C. Mitochondrial dysfunction and pathology in bipolar disorder and schizophrenia. *Int J Dev Neurosci*. 2011 May;29(3):311-24.

Clay HB, Sullivan S, Konradi C. Mitochondrial dysfunction and pathology in bipolar disorder and schizophrenia. *Int J Dev Neurosci*. 2011 May;29(3):311-24.

de Lucena D, Fernandes BS, Berk M, Dodd S, Medeiros DW, Pedrini M, Kunz M, Gomes FA, Giglio LF, Lobato MI, Belmonte-de-Abreu PS, Gama CS. Improvement of negative and positive symptoms in treatment-refractory schizophrenia: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial with memantine as add-on therapy to clozapine. *J Clin Psychiatry*. 2009; 70(10): 1416-23.

de Oliveira L, Fraga DB, De Luca RD, Canever L, Ghedim FV, Matos MP, Streck EL, Quevedo J, Zugno AI. Behavioral changes and mitochondrial dysfunction in a rat model of schizophrenia induced by ketamine. *Metab Brain Dis*. 2011; 26(1): 69-77.

de Oliveira L, Spiazzi CM, Bortolin T, Canever L, Petronilho F, Mina FG, Dal-Pizzol F, Quevedo J, Zugno AI. Different sub-anesthetic doses of ketamine increase oxidative stress in the brain of rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2009 Aug 31;33(6):1003-8.

DeLisi LE, Sakuma M, Maurizio AM, Relja M and Hoff AL (2004) Cerebral ventricular change over the first 10 years after the onset of schizophrenia. *Psychiatry Res* 130: 57–70.

Fischer et al (1985) Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. *Clin Chim Acta* 153:23-26.

Fusar-Poli, P., Pellegrini, F., & Cortesi, M. (2007). Memantine as a neuroprotective agent in early phases of psychosis *Medical Hypotheses*, 68(2), 459–460. doi:10.1016/j.mehy.2006.07.026

Geyer MA, Moghaddam B. Animal models relevant to schizophrenia disorders. In: Davis KL, Dennis Charney D, Coyle JT, Nemeroff C, editors. *Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation of Progress*. USA: The American College of Neuropsychopharmacology; 2002.

Haren NV, Cahn W, Hulshoff Pol HE, Kahn RS. The course of brain abnormalities in schizophrenia: can we slow the progression? *J Psychopharmacol*. 2011 Jul 5. [Epub ahead of print]

Ho BC, Andreasen NC, Nopoulos P, Arndt S, Magnotta V and Flaum M (2003) Progressive structural brain abnormalities and their relationship to clinical outcome: a longitudinal magnetic resonance imaging study early in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 60: 585–594.

Hughes BP. A method for the estimation of serum creatine kinase and its use in comparing creatine kinase and aldolase activity in normal and pathological sera. *Clin Chim Acta*. 1962 Sep;7:597-603.

Hunt MJ, Raynaud B, Garcia R. Ketamine dose-dependently induces high-frequency oscillations in the nucleus accumbens in freely moving rats. *Biol Psychiatry*. 2006 Dec 1;60(11):1206-14.

Huey, E. D., Dustin, I. H., Overman, G. P., Mirza, N., & Sunderland, T. (2005). Development of subtle psychotic symptoms with memantine: a case report *The Journal of clinical psychiatry*, 66(5), 658–659.

Jones PB, Buckley PF. Schizophrenia. Churchill Livingstone, Elsevier. 167 p. 2006.

Karry R, Klein E, Ben Shachar D. Mitochondrial complex I subunits expression is altered in schizophrenia: a postmortem study. *Biol Psychiatry*. 2004 Apr 1;55(7): 676-84.

Kaur P, Radotra B, Minz RW, Gill KD. Impaired mitochondrial energy metabolism and neuronal apoptotic cell death after chronic dichlorvos (OP) exposure in rat brain. *Neurotoxicology*. 2007 Nov;28(6):1208-19.

Lahti et al., 1995a A.C Lahti, H.H Holcomb, D.R Medoff and C.A Tamminga, Ketamine activates psychosis and alters limbic blood flow in schizophrenia. *NeuroReport*, 6 (1995), pp. 869–872.

Lahti et al., 1995b A.C Lahti, B Koffel, D LaPorte and C.A Tamminga, Subanesthetic doses of ketamine stimulate psychosis in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*, 13 (1995), pp. 9–19.

Lahti, A. C., Weiler, M. A., Michaelidis, T., et al (2001) Effects of ketamine on normal and schizophrenic volunteers. *Neuropsychopharmacology*, 25, 455 -467.

Lieberman J, Chakos M, Wu H, Alvir J, Hoffman E, Robinson D, et al. (2001) Longitudinal study of brain morphology in first-episode schizophrenia. *Biol Psychiatry* 49: 487–499.

Lindenmayer JP. Treatment refractory schizophrenia. *Psychiat Quart* 2000; 71:373-84.

Lipska BK, Weinberger DR. To model a psychiatric disorder in animals: schizophrenia as a reality test. *Neuropsychopharmacology*. 2000 Sep;23(3): 223-39.

Littlewood CL, Jones N, O'Neill MJ, Mitchell SN, Tricklebank M, Williams SC. Mapping the central effects of ketamine in the rat using pharmacological MRI. *Psychopharmacology (Berl)*. 2006 May;186(1):64-81.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-267.

Malhotra AK, Pinals DA, Adler CM, Elman I, Clifton A, Pickar D, Breier A. Ketamine-induced exacerbation of psychotic symptoms and cognitive impairment in neuroleptic-free schizophrenics. *Neuropsychopharmacology*. 1997 Sep;17(3):141-50.

Newcomer, J. W., Farber, N. B., Jevtovic-Todorovic, V., et al (1999) Ketamine-induced NMDA receptor hypofunction as a model of memory impairment and psychosis. *Neuropsychopharmacology*, 20, 106 -118.

Ossola B, Schendzielorz N, Chen SH, Bird GS, Tuominen RK, Männistö PT, Hong JS. Amantadine protects dopamine neurons by a dual action: reducing activation of microglia and inducing expression of GDNF in astroglia. *Neuropharmacology*. 2011 Sep;61(4):574-82.

Riederer, P., Lange, K. W., Kornhuber, J., & Danielczyk, W. (1991). Pharmacotoxic psychosis after memantine in Parkinson's disease *Lancet*, 338(8773), 1022–1023.

Ross CA, Margolis RL, Reading SA, Pletnikov M, Coyle JT. Neurobiology of schizophrenia. *Neuron*. 2006 Oct 5;52(1):139-53.

Rustin P et al (1994). Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clin Chim Acta* 228:35-51.

Seeman, P., Caruso, C., & Lasaga, M. (2008). Memantine agonist action at dopamine D2High receptors *Synapse* (New York, N.Y.), 62(2), 149–153. doi: 10.1002/syn.20472

Stefan M, Travis M, Murray R. *An Atlas of Schizophrenia*. London, UK: Parthenon Publishing Group; 2002. (The Encyclopedia of Visual Medicine Series).

Takeyama K, Yoshikawa M, Oka T, Kawaguchi M, Suzuki T, Hashimoto A. Ketamine enhances the expression of serine racemase and D-amino acid oxidase mRNAs in rat brain. *Eur J Pharmacol*. 2006 Jul 1;540(1-3):82-6.

6.4 Artigo 2 - Português

Effects of amantadine on behavior, respiratory chain enzymes and creatine kinase in an animal model of schizophrenia

Gabriel R Fries, David Freitas de Lucena, Camila Lersch, Leila Canever, Renata de Luca, Giseli Daiane Bez, Isabela Casagrande Jeremias, Emilio L Streck, Alexandra L Zugno, Clarissa S Gama

A esquizofrenia é uma doença psiquiátrica altamente debilitante com uma prevalência estimada de cerca de 1-1,5% [Stefan et al., 2002]. Sua apresentação inclui sintomas positivos (alucinações e delírios), sintomas negativos (retraimento social, avolição, achatamento e embotamento afetivo) e cognitivas [Bowie e Harvey 2006]. O tratamento de pacientes com esquizofrenia envolve o início agudo e de manutenção de fármacos, incluindo uma ampla gama de antipsicóticos típicos e atípicos cuja eficácia não é generalizada entre os pacientes [Jones & Buckley, 2006]. O tratamento de manutenção eficaz pode diminuir a frequência e a gravidade dos episódios de doença, reduzir a sua morbidade e mortalidade, e maximizar o funcionamento psicossocial e a qualidade de vida dos pacientes [Jones & Buckley, 2006]. No entanto, muitos pacientes são refratários à medicação, e alguns dos sintomas persiste mesmo

quando a adesão é considerada boa [Lindenmayer 2000]. Neste sentido, mais estudos são necessários na busca de rotinas e drogas mais eficazes para o tratamento de manutenção da esquizofrenia.

Apesar de vários estudos tentando pesquisar os fundamentos neurobiológicos da esquizofrenia, sua fisiopatologia não é completamente compreendida. Parece incluir uma ampla gama de mecanismos, de marcadores genéticos ao estresse oxidativo [Ross et al, 2006;. Bray et al, 2010;. Bitanihirwe et al, 2011.]. Achados neuroanatômicos indicam um decréscimo volumétrico no cérebro como um todo, e principalmente diminuição do volume de massa cinzenta [Haren et al, 2011;. Cahn et al, 2002;. DeLisi et al, 2004;.. Lieberman et al, 2001], bem como um aumento progressivo dos ventrículos corticais e volumes do líquido cefalorraquidiano em pacientes com primeiro episódio de esquizofrenia [Cahn et al, 2002;. DeLisi et al, 2004;. Ho et al, 2003;.. Lieberman et al, 2001]. Tomados em conjunto, estes resultados sugerem a ocorrência de morte neuronal em pacientes.

Entre os possíveis mecanismos levando ao dano neuronal, perturbações no metabolismo energético do cérebro têm sido relatados como fatores importantes [Beal, 1992]. Metabolismo energético prejudicado pode levar à morte neuronal, diminuindo os níveis de ATP e, finalmente, levando à apoptose [Kaur et al., 2007]. De nota, a disfunção mitocondrial, com alterações posteriores nos complexos da cadeia respiratória tem sido implicada na fisiopatologia da esquizofrenia [Clay et al, 2011;. Ben-Shachar, 2002]. Os parâmetros do metabolismo de energia incluem a avaliação de enzimas da cadeia respiratória

mitocondrial e atividade da creatina quinase (CK), que participam na homeostase de energia e indicam o nível de demanda ATP em uma amostra.

Dada a complexidade da doença e a necessidade de uma maior compreensão da sua neurobiologia, diferentes modelos animais de esquizofrenia têm sido empregados [Geyer e Moghaddam, 2002]. Em ratos e macacos, os antagonistas não competitivos NDMA, incluindo fenciclidina e a cetamina (KET), podem produzir uma série de anormalidades comportamentais que se assemelham aos sintomas de esquizofrenia em humanos [Allen e Young, 1978;. Becker et al, 2004]. Tratamento com KET foi mostrado capaz de causar psicose em pacientes esquizofrênicos remetidos de sintomas [Lahti et al, 1995a;. Lahti et al, 1995b;. Lahti et al, 2001.], E o uso desta substância também é usada para avaliar sintomatologia positiva e sintomas negativos em voluntários saudáveis [Newcomer et al., 1999]. Nós e outros autores utilizamos um tratamento crônico com doses de subanestésicas de KET em ratos como modelo animal de esquizofrenia [de Oliveira et al, 2011;. Canever et al, 2010;. Bubeníková-Valesová et al, 2008;. Becker et al. , 2004]. Neste modelo, KET foi capaz de induzir movimentos estereotipados e significativos déficits sociais em diferentes esquemas de tratamento [Canever et al, 2010;. Bubeníková-Valesová et al, 2008; Lipska e Weinberger, 2000]. Ao todo, este modelo tem se mostrado com valor preditivo, e possuidor de validade [de Oliveira et al, 2009;. Becker e Grecksch, 2004;. Becker et al, 2003], e permite seu uso em testes de novos medicamentos em potencial para a esquizofrenia .

Entre as drogas recém testadas, a memantina, um fraco antagonista não-seletivo do receptor NMDA, tem sido relatada capaz de melhorar a cognição e sintomas positivos e negativos em um ensaio randomizado controlado por placebo como adjuvante à clozapina para pacientes refratários ao tratamento com esquizofrenia [de Lucena et al., 2009]. Mais recentemente, a amantadina (AMA), uma molécula análoga a memantina, melhorou a resposta clínica aos sintomas negativos em uma série de casos [Gama et al., 2010], e foi eficaz no tratamento de cinco pacientes com esquizofrenia, transtorno esquizoafetivo (SZA) e catatonia aguda [de Lucena et al., 2011]. AMA pode agir como a memantina, cronicamente reduzindo o estresse oxidativo neuronal dos pacientes tratados, diminuindo a agressão aos neurônios e morte neuronal.

Com base em resultados anteriores, AMA pode ser uma droga promissora para ser testada na esquizofrenia. Uma melhor compreensão do seu mecanismo de ação em estudos pré-clínicos podem apontar para metas relevantes na esquizofrenia e a proposta de novas drogas potenciais para seu tratamento. Para o efeito, foi avaliada a eficácia da AMA na prevenção dos efeitos da KET sobre o comportamento, cadeia respiratória mitocondrial e atividade CK em um modelo animal de esquizofrenia.

Materiais e métodos

Este estudo foi aprovado pelo nosso comitê de ética local e realizada de acordo com as recomendações do NIH Guia para o Cuidado e Uso de Animais

de Laboratório e Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento (SBNeC).

Animais

Ratos Wistar machos adultos (peso 250-300 g) foram obtidos a partir de nossa colônia de reprodução (Animal House Central da Universidade do Extremo Sul Catarinense) e enjaulado em grupos de cinco com alimentos e água ad libitum disponíveis. Eles foram mantidos em uma luz de 12 h / ciclo escuro (luzes acesas às 07:00), a uma temperatura de $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Tratamento

AMA foi administrado ip em 10 mg / kg por 10 dias, seguidos de 7 dias da administração ip subanestésicas de 25 mg / kg KET (Hunt et al, 2006;.. De Oliveira et al, 2011). Salina (SAL) injeções foram realizadas como controles para ambas AMA e KET, totalizando quatro grupos experimentais: SAL + SAL, SAL + KET, AMA + SAL, e AMA + KET. Trinta minutos após a última injeção, os ratos foram colocados em um aparelho de campo aberto e avaliados conforme descrito abaixo.

Avaliação comportamental

Teste do Campo Aberto

Atividade locomotora foi avaliada em 25 x de 50 x 50 cm de campo aberto cercado por paredes feitas de madeira marrom com uma parede de vidro frontal.

O piso da arena foi dividido em 12 retângulos iguais por linhas pretas. Os animais foram delicadamente colocados no retângulo esquerdo traseiro e foram autorizados a explorar a arena por 60 minutos. Atividade locomotora foi constantemente monitorada por um sistema instalado na arena com seis barras paralelas, cada uma das quais continha 16 sensores infravermelhos que detectam a posição exata do rato e do movimento, permitindo uma análise detalhada do comportamento de cada animal. Informações detectadas pelos sensores são transmitidos para um computador em que a atividade do animal é registrado a cada 5 minutos por um software dedicado (banco de dados: versão Open Source do Interbase 6.01). Número de cruzamentos, rearings e limpeza foram contados.

Estereotipia

Estereotipia foi definida como os movimentos repetitivos e rápidos da cabeça, e patas superiores. Este parâmetro foi analisado ao mesmo tempo e lugar junto a atividade locomotora. Estereotipia é considerado pelo software como um movimento instável, a qualquer momento, quando os movimentos repetitivos são registrados nas leituras sequenciais, sem alteração no centro de animais em massa. As unidades de medida possível a ser considerados são mm (milímetros), cm (centímetros) e em polegadas.

Tecidos e preparação homogeneizado

Animais foram sacrificados por decapitação 60 min após as análises comportamentais. Os cérebros foram removidos e o hipocampo, córtex pré-frontal, estriado e amígdala foram homogeneizadas (1:10, w / v) em tampão SETH, pH 7,4 (250 mM de sacarose, 2 mM EDTA, 10 mM Trizma base, 50 UI de heparina / ml). Homogeneizados foram centrifugados a 800 xg por 10 minutos e os sobrenadantes foram mantidos a -70 ° C até serem utilizados para a determinação da atividade enzimática.

Ensaio de atividade de creatina quinase

Atividade da creatina quinase cerebral foi medida em homogenatos pré-tratados com 0,625 mM maltosídeo lauril. A mistura de reação consistiu de 60 mM Tris-HCl, pH 7,5, contendo 7 fosfocreatina mM, 9 mM MgSO₄ e cerca de 0,4-1,2 mg de proteína em um volume final de 100 µL. Após 15 min de pré-incubação a 37 ° C, a reação foi iniciada pela adição de 0,3 mmol de ADP mais 0,08 mmol de glutatona reduzida. A reação foi interrompida após 10 min pela adição de 1 mmol de p-hydroxymercuribenzoico ácido. A creatina formada foi estimada de acordo com o método colorimétrico de Hughes et al (1962). A cor foi desenvolvida pela adição de 100 µL 2% µ-naftol e 100% 0,05 mL de diacetil em um volume final de 1 mL e lido espectrofotometricamente após 20 min a 540 nm. Resultados foram expressos em unidades (min x mg de proteína)⁻¹.

Atividade da enzima da cadeia respiratória

Complexo I ou NADH desidrogenase, foi avaliada utilizando o método descrito por Cassina e Radi (1996) pela taxa de NADH-dependente redução de ferricianeto em 420 nm. O complexo de atividade II foi determinado pelo método descrito por Fischer e colegas (1985), e foi medido seguindo a queda na absorvância devido à redução de 2,6-DCIP em 600 nm. O complexa de atividade I-III foi medido pelo citocromo c e redução de succinato a 550 nm a 37 ° C de acordo com o método de Birch-Machin e colegas (1994). A atividade da citocromo c oxidase (complexo IV) foi ensaiada de acordo com o método descrito por Rustin e colegas (1994), em que a diminuição da absorvância devido à oxidação do citocromo c anteriormente reduzido a 550 nm é seguido. A atividade da cadeia respiratória mitocondrial e seus complexos foram calculados como nmol / min.mg proteína.

Teor de proteína

Teor de proteína foi determinada pelo método descrito por Lowry e colaboradores (1951) usando soro albumina bovina como padrão.

Análise estatística

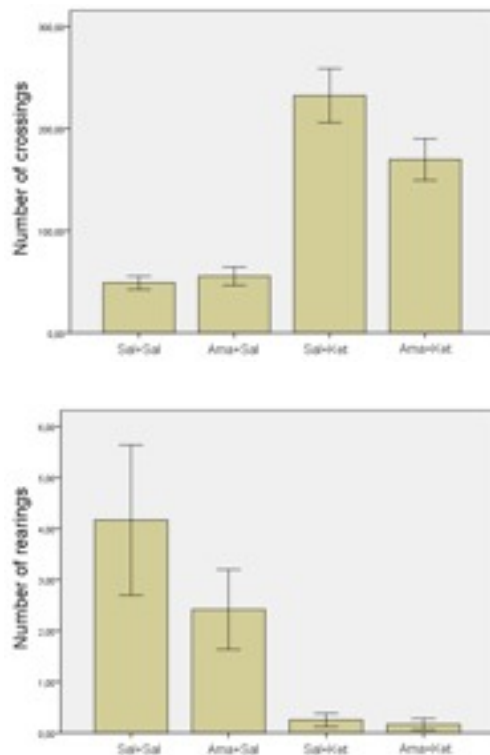
Os dados foram analisados utilizando o software SPSS 18 (Statistical Package for the Social Sciences). Número de cruzamentos e levantamentos, grooming, atividade da creatina quinase, e a atividade dos complexos da cadeia respiratória foram todos equipados com uma distribuição curva padrão, e, portanto, submetidos a análises paramétricas. Grupos foram comparados por ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey. P-valores $<0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Estereotipia e seus dados não foram instalados em uma curva de distribuição normal, e foram analisados por Kruskal-Wallis, seguido de Mann-Whitney comparações entre os grupos. Após as correções de Bonferroni, P-valor $<0,0125$ foram considerados estatisticamente significativos.

Resultados

Teste do campo aberto

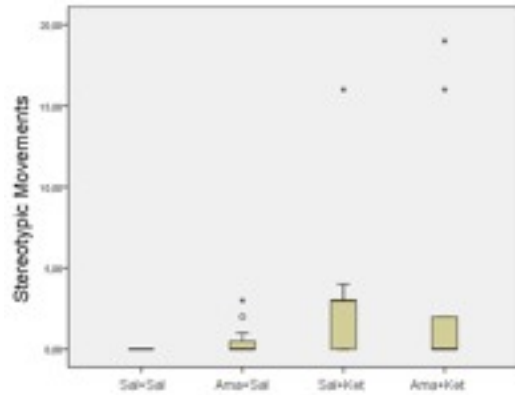
KET aumentou significativamente o número de cruzamentos ($F(3, 44) = 26,089$, $p < 0,001$) quando comparado ao grupo controle. Este aumento não foi impedido pela AMA no grupo AMA + KET ($p < 0,001$), embora parecia haver uma tendência para diminuir este parâmetro ($p = 0,07$, SAL + KET vs AMA + KET).

O número de levantamentos foi significativamente diminuído em SAL + KET e grupos AMA + KET ($F(3, 44) = 5,245$, $p = 0,004$), quando comparado ao grupo controle. AMA per se não induziu alterações no número de cruzamentos ou rearings (levantamentos).



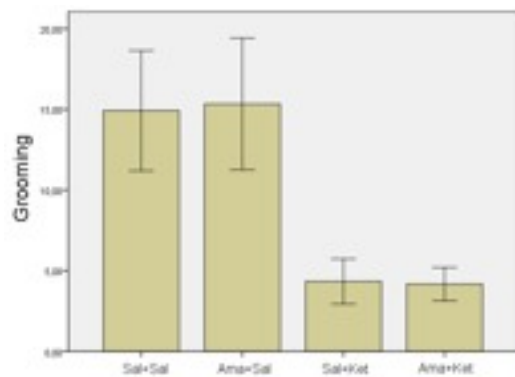
Movimentos de estereotipia

Estereotipia foi significativamente alterada em relação ao tratamento ($H(3) = 13,601, p = 0,04$). KET aumentou significativamente movimentos estereotipados, quando comparado ao grupo controle ($U = 24, Z = -3,323, p = 0,001$) e AMA tratamento preveniu parcialmente esse comportamento, pois AMA + KET não diferiram significativamente do grupo controle ($U = 42, Z = -2,44, p = 0,015$) a partir de SAL + KET ($U = 58, Z = -0,965, p = 0,335$).



Grooming

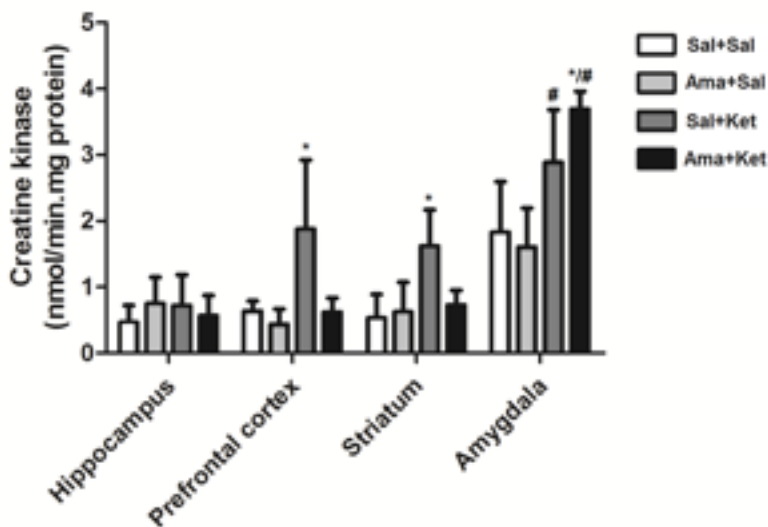
Grooming foi significativamente reduzido em SAL + KET e grupos AMA + KET, quando comparado ao grupo controle ($F(3, 44) = 4,701, p = 0,006$). Não foi encontrada diferença entre SAL + KET e AMA + KET.



Atividade da creatina quinase

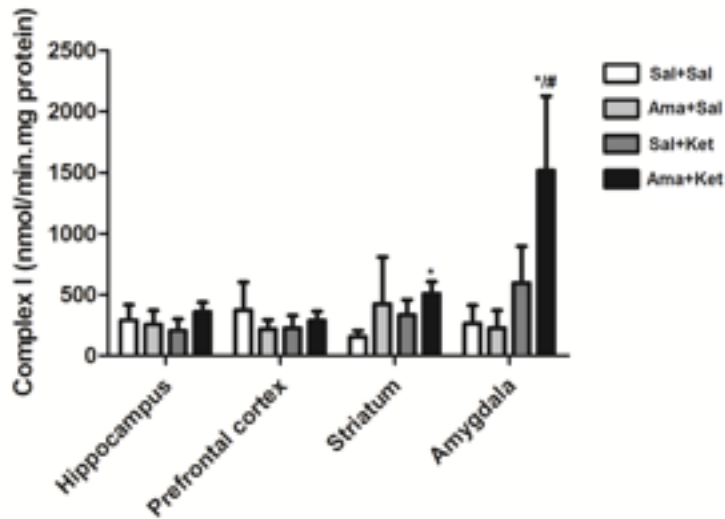
Tratamento com KET aumento da atividade CK no córtex pré-frontal ($F(3, 18) = 8,253, p = 0,001$), striatum ($F(3, 19) = 8,251, p = 0,001$) e amígdala ($F(3,$

17) = 10,983), $p < 0,001$). Este aumento foi impedido pela AMA no córtex pré-frontal e striatum, mas não na amígdala ($p = 0,323$, quando comparado a SAL + KET). No hipocampo, nenhuma diferença foi encontrada entre os grupos. AMA como tratamento por si só não alterou a atividade CK quando comparado ao grupo controle.



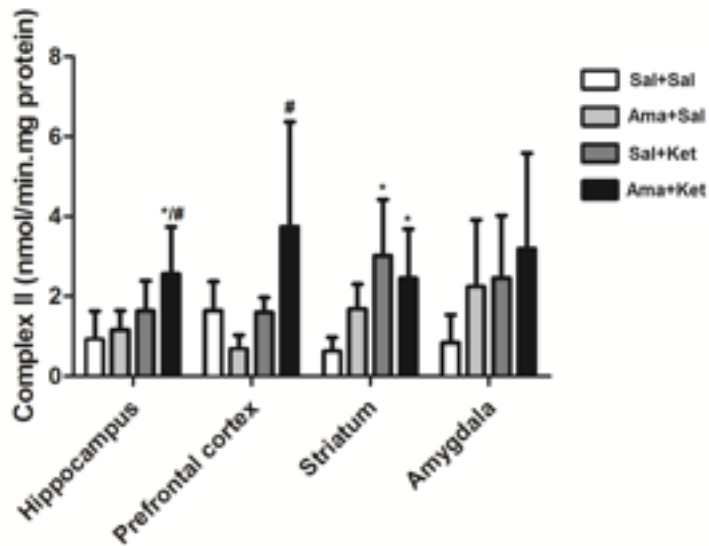
Complexo I

KET como tratamento por si só não alterou a atividade do complexo I. No entanto, quando combinada a AMA, aumentou a atividade da enzima no estriado ($F(22, 3) = 2,948$, $p = 0,045$) e na amígdala ($F(3, 15) = 13,995$, $p < 0,001$). Não mais diferenças foram encontradas entre os grupos no hipocampo ou do córtex pré-frontal.



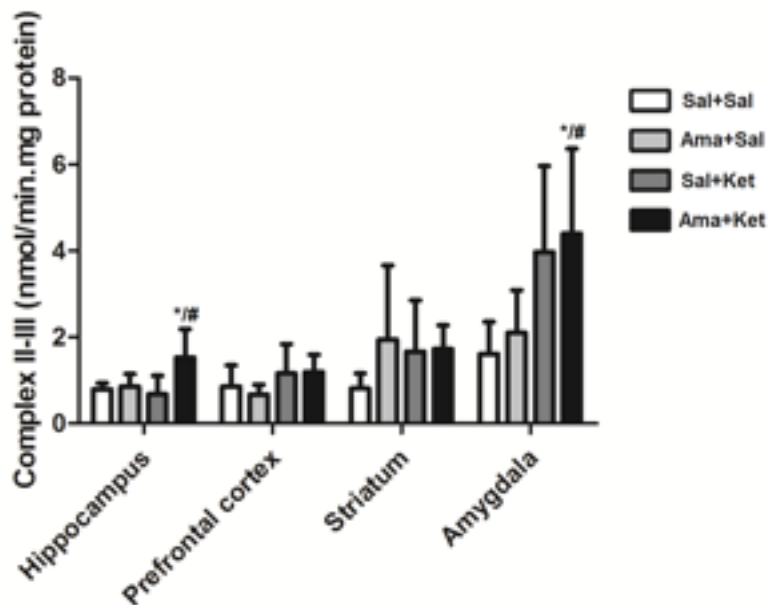
Complexo II

O tratamento com KET aumentou a atividade do complexo II no estriado ($F(3, 21) = 7,153, p = 0,002$), enquanto que a combinação de AMA + KET resultou em aumento dessa atividade no hipocampo ($F(3, 23) = 5,171, p = 0,007$), córtex pré-frontal ($F(3, 18) = 5,041, p = 0,01$), e striatum ($F(3, 21) = 7,153, p = 0,002$). Não foram encontradas diferenças entre os grupos na amígdala.



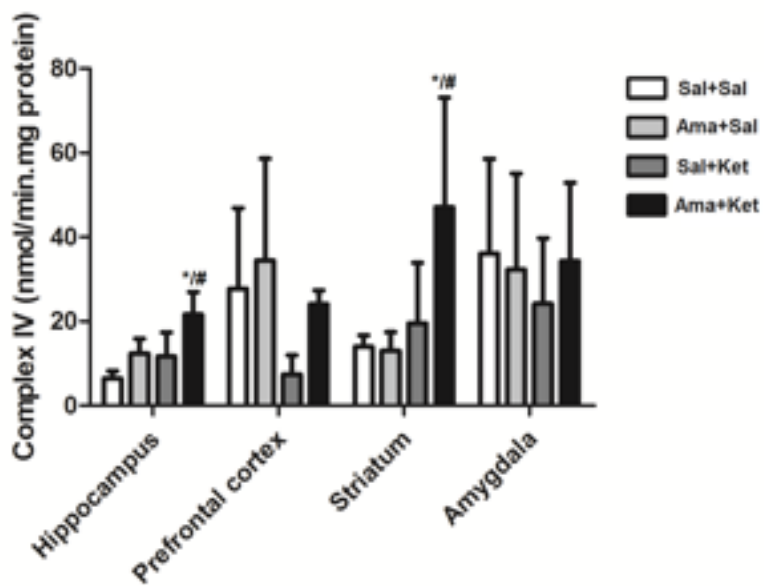
Complexo I-III

Considerando KET por si só, esta não alterou a atividade de complexos I-III em nenhuma das regiões do cérebro, AMA + KET aumentou a sua actividade no hipocampo ($F(3, 22) = 5,166$, $p = 0,007$) e na amígdala ($F(3, 18) = 5,54$, $p = 0,07$). Não foram encontradas diferenças entre os grupos no córtex pré-frontal e no estriado.



Complexo IV

O tratamento AMA + KET resultou em aumento da atividade do complexo IV no hipocampo ($F(3, 16) = 8,31, p = 0,001$) e no estriado ($F(3, 14) = 5,087, p = 0,014$), enquanto tratamento de KET per se teve nenhum efeito sobre a atividade enzimática. Não houve diferenças entre os grupos foram no córtex pré-frontal e na amígdala.



Discussão

Entre várias drogas recém testadas para o tratamento da esquizofrenia, os antagonistas não seletivos NMDA parecem ter um potencial importante para uma resposta adjuvante bem sucedida. Em um modelo animal de esquizofrenia induzido por tratamento com KET, AMA impediu parcialmente a estereotipia induzida KET, bem como o aumento da atividade da CK no córtex pré-frontal e striatum. No entanto, AMA não impediu o aumento na atividade do complexo II induzido por KET, e agiu de forma sinérgica com KET para aumentar as atividades das enzimas da cadeia respiratória em outras regiões diferentes do cérebro. Em resumo, estes resultados sugerem que a AMA não é totalmente eficaz na prevenção de efeitos da KET, e indicam uma ação sinérgica de ambas as drogas na modulação de enzimas atividades da cadeia respiratória.

Administrações sub-anestésica de KET têm sido constantemente utilizado como um modelo animal de esquizofrenia válido. Dada a sua função como um antagonista NMDA potente, esta droga pode produzir alucinações e delírios paranoides em seres humanos [Malhotra et al., 1997], que são semelhantes aos sintomas positivos característicos de pacientes esquizofrênicos. Como discutido em outro lugar, este modelo reproduz os sintomas positivos e negativos da doença, bem como a sua deficiência cognitiva [Hunt et al, 2006, Littlewood et al, 2006;.. Takeyama et al, 2006.], Que o torna adequado para teste potencial de novos medicamentos para o tratamento da esquizofrenia. De nota, efeitos KET incluem mudanças no sistemas dopaminérgico, glutamatérgico e serotoninérgico, que em última análise irão ocasionar o aumento de receptores D2 no hipocampo, diminuição dos receptores glutamatérgicos no PFC, e aumento da densidade de transportadores de dopamina e serotonina no hipocampo, estriado e PFC [Becker, 2003] . Cada um desses efeitos podem influenciar diferencialmente características comportamentais induzidas por KET, e pode ser responsável pela modulação, como demonstrado anteriormente [de Oliveira et al., 2011] de funções mitocondriais.

Testes comportamentais mostraram que KET aumentou significativamente o número de travessias avaliadas pelo teste de campo aberto, bem como reduziu o comportamento de limpeza. Estas características induzidas por KET foram relatadas em outros estudos [de Oliveira et al, 2011;. Canever et al, 2010], e parecem sugerir uma validade relevante para este modelo animal. No entanto,

nossos resultados mostram que AMA não foi capaz de evitar esses efeitos comportamentais, o que poderia sugerir uma falta de validade preditiva para este modelo. KET também aumentou significativamente movimentos estereotipados, que foram parcialmente controlados pela AMA. Ensaio clínico colocam pontos para uma eficácia da amantadina e memantina na melhora dos sintomas positivos e negativos em pacientes esquizofrênicos [de Lucena et al., 2009 and 2011], o que sugere que os efeitos da AMA pode estar mais relacionado à reversão dos sintomas ao invés de prevenção (tratamento de manutenção), avaliado em nosso estudo. Além disso, o tratamento KET corresponde principalmente a fase aguda da doença, e é possível que AMA pode ser mais eficiente na esquizofrenia durante o tratamento crônico. Mais estudos são necessários avaliando a eficácia da AMA em reverter os efeitos comportamentais induzidos por KET.

A falta de eficácia na prevenção da AMA efeitos KET também pode ser visto nos complexos da cadeia respiratória, onde na maioria dos casos, a alteração foi encontrada apenas no combinado AMA + KET grupo, e não em ratos tratados somente com KET. Curiosamente, parece haver um efeito sinérgico de ambos os fármacos em todas as enzimas. Isto pode ser explicado pelo fato de que ambas as drogas são antagonistas NMDA, e é possível que esse efeito poderia ser um importante modulador das atividades da cadeia respiratória enzima avaliada neste modelo. De nota, AMA apresentam outros mecanismos de ação que conta para seus efeitos neuroprotetores, que incluem a inibição da liberação de microglial fatores pró-inflamatórios, um aumento na

expressão de fatores neurotróficos como o GDNF de astroglia, entre outros [Ossola et al., 2011]. De fato, foi relatado que a inibição do receptor NMDA não é crucial para os efeitos neuroprotetores da AMA [Ossola et al., 2011]. Estes dados enfatizando outros mecanismos de ação AMA justificar seu uso na prevenção KET efeitos induzidos, mesmo que ambos são antagonistas NMDA, e aguarda novas experiências para esclarecer a relevância desses efeitos diferentes sobre a sua eficácia para o tratamento da esquizofrenia.

Disfunção da mitocôndria tem sido relatada como um importante aspecto fisiopatológico da esquizofrenia [Clay et al., 2011; Ben-Shachar e Laifenfeld, 2004; Ben-Shachar, 2002]. Resumidamente, ele inclui hipoplasia mitocondrial, a expressão alterada de genes mitocondria-relacionados, e comprometimento do sistema de fosforilação oxidativa em pacientes [Karry et al., 2004]. Além disso, a morfologia mitocondrial anormal e proporção e densidade fora do padrão especificado já foram encontrados no cérebro de indivíduos esquizofrênicos [Ben-Shachar, 2002]. Da mesma forma, a disfunção mitocondrial foi investigada após administração de KET a ratos [de Oliveira et al., 2011]. Um estudo anterior do nosso grupo demonstrou que o tratamento KET per se, não só aumenta a atividade do complexo I no estriado, hipocampo e no PFC, mas também aumenta a atividade I-II complexo no striatum, e também ele a atividade do complexo IV no hipocampo e estriado [de Oliveira et al., 2011]. No entanto, nossos resultados não mostraram diferenças entre tais grupos. Encontramos um efeito sinérgico de KET + AMA no aumento da atividade do complexo I na amígdala e no striatum, bem como do complexo II e IV no hipocampo e no

estriado, e complexo I-III no hipocampo e na amígdala. Tratamento de KET per se apenas gerou o aumento da atividade do complexo II no striatum, que não foi observado em nosso estudo anterior [de Oliveira et al., 2011]. Possíveis razões para esta discrepância é o efeito sinérgico entre estes fármacos nos receptores NMDA, sem o uso profilático de neurolepticos para estabilizar os sistemas dopaminérgicos e glutamatergicos. Em geral, o aumento da actividade da cadeia respiratória nos complexos mitocondriais que foram encontrados nas amostras podem refletir um aumento da oferta de demanda energética de funções celulares nessas situações.

Tal aumento da demanda energética também é refletida por nossos resultados de CK. CK catalisa a conversão reversível da creatina ATP e consome para criar fosfocreatina e ADP, assim agindo para manter a homeostase energética. Nossos resultados mostram que o aumento da atividade da CK no PFC, estriado e amígdala estão em conformidade com estudos anteriores [Canever et al., 2010], e sugere uma maior demanda ATP nestes tecidos. Além disso, AMA impediu com sucesso esse aumento no PFC e estriado, não apresentando este efeito sobre amígdala. É possível que esta prevenção induzida pela AMA na atividade CK podem estar associados com a prevenção de movimentos estereotipados, mas até agora não podemos descartar outras possíveis mecanismos pelos quais isso poderia interferir nos efeitos KET.

Algumas limitações devem ser levadas em conta ao analisar os nossos dados. Em primeiro lugar, embora o tratamento KET tem sido empregado com

sucesso como modelo animal de esquizofrenia, ela apresenta limitações óbvias quando se considera a complexidade da doença sendo impossível mimetizar esta patologia simplesmente com uma administração de antagonista NMDA durante 07 dias em ratos. No entanto, tal limitação é comum a quase todos os modelos animais que existem, e no momento, é o que garante mais pesquisas sobre o desenvolvimento de novas drogas e tratamentos confiáveis para as doenças humanas. Além disso, a eficácia da AMA sobre a prevenção de sintomas esquizofrênicos seria melhor avaliada em outros modelos animais de esquizofrenia, em vez deste nosso modelo utilizado (por um antagonista NMDA). Neste caso, considerou-se que outros mecanismos de ação de KET e AMA são cruciais para os seus efeitos, justificando assim a sua utilização combinada neste estudo.

Em resumo, mostramos que a AMA foi capaz de impedir movimentos estereotipados induzidos por KET e impediu o aumento da atividade CK, ao passo que AMA não teve efeito sobre a atividade locomotora e na atividade dos complexos da cadeia mitocondrial. Baseado em dados clínicos apontando para uma eficácia de AMA no tratamento de pacientes, nossos resultados sugerem que outros modelos animais de esquizofrenia devem ser empregadas no estudo da AMA como uma droga de potencial terapêutico para esta doença.

References

Allen and Young, 1978 R.M Allen and S.J Young, Phencyclidine-induced psychosis. *Am. J. Psychiatry*, 135 (1978), pp. 1081–1084.

Beal MF. Does impairment of energy metabolism result in excitotoxic neuronal death in neurodegenerative illnesses? *Ann Neurol*. 1992 Feb;31(2):119-30.

Becker A, Grecksch G. Ketamine-induced changes in rat behaviour: a possible animal model of schizophrenia. Test of predictive validity. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2004 Dec;28(8):1267-77.

Becker A, Peters B, Schroeder H, Mann T, Huether G, Grecksch G. Ketamine-induced changes in rat behaviour: A possible animal model of schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2003 Jun;27(4):687-700.

Ben-Shachar D, Laifenfeld D. Mitochondria, synaptic plasticity, and schizophrenia. *Int Rev Neurobiol*. 2004;59:273-96.

Ben-Shachar D. Mitochondrial dysfunction in schizophrenia: a possible linkage to dopamine. *J Neurochem*. 2002 Dec;83(6):1241-51.

Ben-Shachar D. The interplay between mitochondrial complex I, dopamine and Sp1 in schizophrenia. *J Neural Transm*. 2009 Nov;116(11):1383-96.

Birch-Machin MA et al (1994) An evaluation of the measurement of the activities of complexes I-IV in the respiratory chain of human skeletal muscle mitochondria. *Biochem Med Metab Biol* 51:35-42.

Bitanihirwe BK, Woo TU. Oxidative stress in schizophrenia: an integrated approach. *Neurosci Biobehav Rev*. 2011 Jan;35(3):878-93.

Bray NJ, Leweke FM, Kapur S, Meyer-Lindenberg A. The neurobiology of schizophrenia: new leads and avenues for treatment. *Curr Opin Neurobiol*. 2010 Dec;20(6):810-5.

Bubeníková-Valesová V, Horáček J, Vrajová M, Höschl C. Models of schizophrenia in humans and animals based on inhibition of NMDA receptors. *Neurosci Biobehav Rev*. 2008 Jul;32(5):1014-23.

Cahn W, Hulshoff Pol HE, Lems EB, van Haren NE, Schnack HG, Van Der Linden JA, et al. (2002) Brain volume changes in first-episode schizophrenia: a 1-year follow-up study. *Arch Gen Psychiatry* 59: 1002–1010.

Canever L, Oliveira L, D'Altoé de Luca R, Correa PT, de B Fraga D, Matos MP, Scaini G, Quevedo J, Streck EL, Zugno AI. A rodent model of schizophrenia reveals increase in creatine kinase activity with associated behavior changes. *Oxid Med Cell Longev*. 2010; 3(6):421-7.

Cassina A, Radi R (1996) Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. *Arch Biochem Biophys* 328:309-316.

Clay HB, Sullivan S, Konradi C. Mitochondrial dysfunction and pathology in bipolar disorder and schizophrenia. *Int J Dev Neurosci*. 2011 May;29(3):311-24.

Clay HB, Sullivan S, Konradi C. Mitochondrial dysfunction and pathology in bipolar disorder and schizophrenia. *Int J Dev Neurosci*. 2011 May;29(3):311-24.

de Lucena D, Fernandes BS, Berk M, Dodd S, Medeiros DW, Pedrini M, Kunz M, Gomes FA, Giglio LF, Lobato MI, Belmonte-de-Abreu PS, Gama CS. Improvement of negative and positive symptoms in treatment-refractory schizophrenia: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial with memantine as add-on therapy to clozapine. *J Clin Psychiatry*. 2009; 70(10):1416-23.

de Oliveira L, Fraga DB, De Luca RD, Canever L, Ghedim FV, Matos MP, Streck EL, Quevedo J, Zugno AI. Behavioral changes and mitochondrial dysfunction in a rat model of schizophrenia induced by ketamine. *Metab Brain Dis*. 2011; 26(1):69-77.

de Oliveira L, Spiazzi CM, Bortolin T, Canever L, Petronilho F, Mina FG, Dal-Pizzol F, Quevedo J, Zugno AI. Different sub-anesthetic doses of ketamine increase oxidative stress in the brain of rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2009 Aug 31;33(6):1003-8.

DeLisi LE, Sakuma M, Maurizio AM, Relja M and Hoff AL (2004) Cerebral ventricular change over the first 10 years after the onset of schizophrenia. *Psychiatry Res* 130: 57–70.

Fischer et al (1985) Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. *Clin Chim Acta* 153:23-26.

Geyer MA, Moghaddam B. Animal models relevant to schizophrenia disorders. In: Davis KL, Dennis Charney D, Coyle JT, Nemeroff C, editors. *Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation of Progress*. USA: The American College of Neuropsychopharmacology; 2002.

Haren NV, Cahn W, Hulshoff Pol HE, Kahn RS. The course of brain abnormalities in schizophrenia: can we slow the progression? *J Psychopharmacol*. 2011 Jul 5. [Epub ahead of print]

Ho BC, Andreasen NC, Nopoulos P, Arndt S, Magnotta V and Flaum M (2003) Progressive structural brain abnormalities and their relationship to clinical outcome: a longitudinal magnetic resonance imaging study early in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 60: 585–594.

Hughes BP. A method for the estimation of serum creatine kinase and its use in comparing creatine kinase and aldolase activity in normal and pathological sera. *Clin Chim Acta*. 1962 Sep;7:597-603.

Hunt MJ, Raynaud B, Garcia R. Ketamine dose-dependently induces high-frequency oscillations in the nucleus accumbens in freely moving rats. *Biol Psychiatry*. 2006 Dec 1;60(11):1206-14.

Jones PB, Buckley PF. *Schizophrenia*. Churchill Livingstone, Elsevier. 167 p. 2006.

Karry R, Klein E, Ben Shachar D. Mitochondrial complex I subunits expression is altered in schizophrenia: a postmortem study. *Biol Psychiatry*. 2004 Apr 1;55(7): 676-84.

Kaur P, Radotra B, Minz RW, Gill KD. Impaired mitochondrial energy metabolism and neuronal apoptotic cell death after chronic dichlorvos (OP) exposure in rat brain. *Neurotoxicology*. 2007 Nov;28(6):1208-19.

Lahti et al., 1995a A.C Lahti, H.H Holcomb, D.R Medoff and C.A Tamminga, Ketamine activates psychosis and alters limbic blood flow in schizophrenia. *NeuroReport*, 6 (1995), pp. 869–872.

Lahti et al., 1995b A.C Lahti, B Koffel, D LaPorte and C.A Tamminga, Subanesthetic doses of ketamine stimulate psychosis in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*, 13 (1995), pp. 9–19.

Lahti, A. C., Weiler, M. A., Michaelidis, T., et al (2001) Effects of ketamine on normal and schizophrenic volunteers. *Neuropsychopharmacology*, 25, 455 -467.

Lieberman J, Chakos M, Wu H, Alvir J, Hoffman E, Robinson D, et al. (2001) Longitudinal study of brain morphology in first-episode schizophrenia. *Biol Psychiatry* 49: 487–499.

Lindenmayer JP. Treatment refractory schizophrenia. *Psychiat Quart* 2000; 71:373-84.

Lipska BK, Weinberger DR. To model a psychiatric disorder in animals: schizophrenia as a reality test. *Neuropsychopharmacology*. 2000 Sep;23(3): 223-39.

Littlewood CL, Jones N, O'Neill MJ, Mitchell SN, Tricklebank M, Williams SC. Mapping the central effects of ketamine in the rat using pharmacological MRI. *Psychopharmacology (Berl)*. 2006 May;186(1):64-81.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-267.

Malhotra AK, Pinals DA, Adler CM, Elman I, Clifton A, Pickar D, Breier A. Ketamine-induced exacerbation of psychotic symptoms and cognitive impairment in neuroleptic-free schizophrenics. *Neuropsychopharmacology*. 1997 Sep;17(3): 141-50.

Newcomer, J. W., Farber, N. B., Jevtovic-Todorovic, V., et al (1999) Ketamine-induced NMDA receptor hypofunction as a model of memory impairment and psychosis. *Neuropsychopharmacology*, 20, 106 -118.

Ossola B, Schendzielorz N, Chen SH, Bird GS, Tuominen RK, Männistö PT, Hong JS. Amantadine protects dopamine neurons by a dual action: reducing activation of microglia and inducing expression of GDNF in astroglia. *Neuropharmacology*. 2011 Sep;61(4):574-82.

Ross CA, Margolis RL, Reading SA, Pletnikov M, Coyle JT. Neurobiology of schizophrenia. *Neuron*. 2006 Oct 5;52(1):139-53.

Rustin P et al (1994). Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clin Chim Acta* 228:35-51.

Stefan M, Travis M, Murray R. *An Atlas of Schizophrenia*. London, UK: Parthenon Publishing Group; 2002. (The Encyclopedia of Visual Medicine Series).

Takeyama K, Yoshikawa M, Oka T, Kawaguchi M, Suzuki T, Hashimoto A. Ketamine enhances the expression of serine racemase and D-amino acid oxidase mRNAs in rat brain. *Eur J Pharmacol*. 2006 Jul 1;540(1-3):82-6.

6.5 Artigo 3 Anexo

Revista Brasileira de Psiquiatria 2010

Gama, Clarissa Severino, David De Lucena, Cíntia Cruz, Maria Inês Lobato, and Paulo Silva Belmonte-de-Abreu. 2010. "Improvement of schizophrenia negative and positive symptoms with amantadine as add-on therapy to antipsychotics." *Revista brasileira de psiquiatria (São Paulo, Brazil : 1999)* 32 (2) (June): 193–194.

Improvement of schizophrenia negative and positive symptoms with amantadine as add-on therapy to antipsychotics.

David De Lucena, Clarissa Severino Gama, Cíntia Cruz, Maria Inês Lobato, Paulo Silva Belmonte-de-Abreu

Dear Editor,

It has been suggested that glutamate deregulation may be involved in the neuropathology of schizophrenia (SZ), mainly through N-methyl-d-aspartate receptor (NMDA) dysfunction.¹ Memantine, a drug approved by the FDA for the treatment of moderate to severe Alzheimer's disease, acts as weak non-selective NMDA receptor antagonist. Our group conducted the first randomized placebo-controlled clinical trial with memantine adjunctive to clozapine for the treatment-refractory SZ.² Surprisingly, the improvement was not only on negative symptoms domain, we also found improvement on positive symptoms and cognition. We report the results of Amantadine, a memantine's derivate, as adjunctive therapy to antipsychotics in four cases of DSM-IV SZ. The four subjects were clinically stabilized, but presented with a pronounced motor retardation, blunted affect, emotional withdrawal and anxiety, scoring at least 3 for each

of these items at The Brief Psychiatric Rating Scale (BPRS). The subjects gave informed consent for experimental use of amantadine with the dose increased up to 400mg/day over 6 weeks. Clinical response was assessed by BPRS on baseline and at sixth week and, Clinical Global Impression scale for Improvement (CGI-I) at the sixth week: - 3 = very much worse, - 2 = much worse, - 1 = slightly worse, 0 = unchanged, + 1 = slightly improved, + 2 = much improved, + 3 = very much improved. The case series are described in Table 1.

Table 1. Patients with schizophrenia treated with amantadine

Patient	Age (years)	Age at onset (years)	Sex	Dose (mg/day)	CGI-I	Concurrent medications (mg/day)	Reported side effects	BPRS Baseline	BPRS Week 6
1	22	21	Male	400	Very much improved	Risperidone (2), citalopram (40)	None	29	4
2	30	19	Female	400	Much improved	Haloperidol (12.5)	None	39	16
3	32	28	Female	400	Very much improved	Haloperidol (30), diazepam (40)	None	54	24
4	24	20	Female	400	Very much improved	Haloperidol (10), quetiapine (1000)	None	70	31

CGI-I, Clinical Global Impression; BPRS, Brief Psychiatric Rating Scale

These cases illustrate a clinical response to negative symptoms beyond positive symptoms improvement. Some lines of evidence suggest that amantadine would be helpful for SZ positive, negative and cognitive symptom domains treatment. It is capable to increase monoaminergic tonus, through dopamine, noradrenaline and serotonin increasement in amygdala and hippocampus conferring an antidepressant profile.³ Its direct modulation of glutamate, through partial agonism of NMDA receptors has and

important role on cognition, learning and new memories recall, contributing for Brain derived neurotrophic factor (BDNF) cerebral increase and neuronal membrane stabilization.⁴ There is evidence that oxidative stress is increased in patients with SZ.⁵ As previously reported, memantine may be considered a neuroprotective drug, by increasing BDNF levels and preventing dopamine deficit.² Thus, amantadine may act like memantine by chronically reducing neuronal oxidative stress of treated patients, decreasing aggression to neurons and neuronal death. Our findings need to be replicated in a larger sample size and over a longer follow-up in order to better evaluate the potential benefits of this adjunctive treatment. However, this report adds to the evidence base supporting a key role of glutamate in the pathophysiology of SZ.

1. Bressan RA, Pilowsky LS. The Glutamatergic Hypothesis of Schizophrenia. *Rev Bras Psiquiatr* 2003;25(3):177-183.
2. De Lucena D, Fernandes B, Berk M, Dodd S, Medeiros D, Pedrini M, Kunz M, Gomes F, Giglio L, Lobato MI, Belmonte-de-Abreu PS, GAMA CS. Improvement of schizophrenia negative and positive symptoms: A double-blind, randomized, placebo-controlled trial with memantine as add-on therapy to clozapine. *J Clin Psychiatry*. 2009;70(10):1416-23.
3. Peeters M, Page G, Maloteaux JM, Hermans E. Hypersensitivity of dopamine transmission in the rat striatum after treatment with the NMDA receptor antagonist amantadine. *Brain Res*. 2002;949(1-2):32-41.

4. Morvanova M, Lakso M, Pirhonen J, Nawa H, Wong G, Castren E: The neuroprotective agent memantine induces brain-derived neurotrophic factor and trkB receptor expression in rat brain. *Mol Cell Neurosci* 2001;18: 247–258.
5. Gama CS, Berk M, Andreazza AC, Kapczinski F, Belmonte-de-Abreu P. Serum levels of brain-derived neurotrophic factor and thiobarbituric acid reactive substances in chronically medicated schizophrenic patients: a positive correlation. *Rev Bras Psiquiatr.* 2008;30(4):337-40.

7. Conclusões e Considerações Finais

No presente momento ainda não há possibilidade terapêutica de prevenção na esquizofrenia e a maior parte das medicações são utilizadas da tentativa da reabilitação dos pacientes que já se encontram psicóticos. O futuro do tratamento destes pacientes esta justamente da descoberta de novas moléculas capazes de tratar, e até prevenir a progressão da patologia para estágios de sintomas graves comparáveis a uma demência, conforme descrito por Kraepelin.

Paulatinamente, o tratamento da esquizofrenia tem saindo do foco sintomático, onde a regra é o bloqueio dopaminérgico, e esta rumando para um foco integrador, onde a desregulação de conectividade neuronal, desregulação glutamatérgica e ativação patológica de vias inflamatórias tornam-se de grande importância. (Ver Anexo 01)

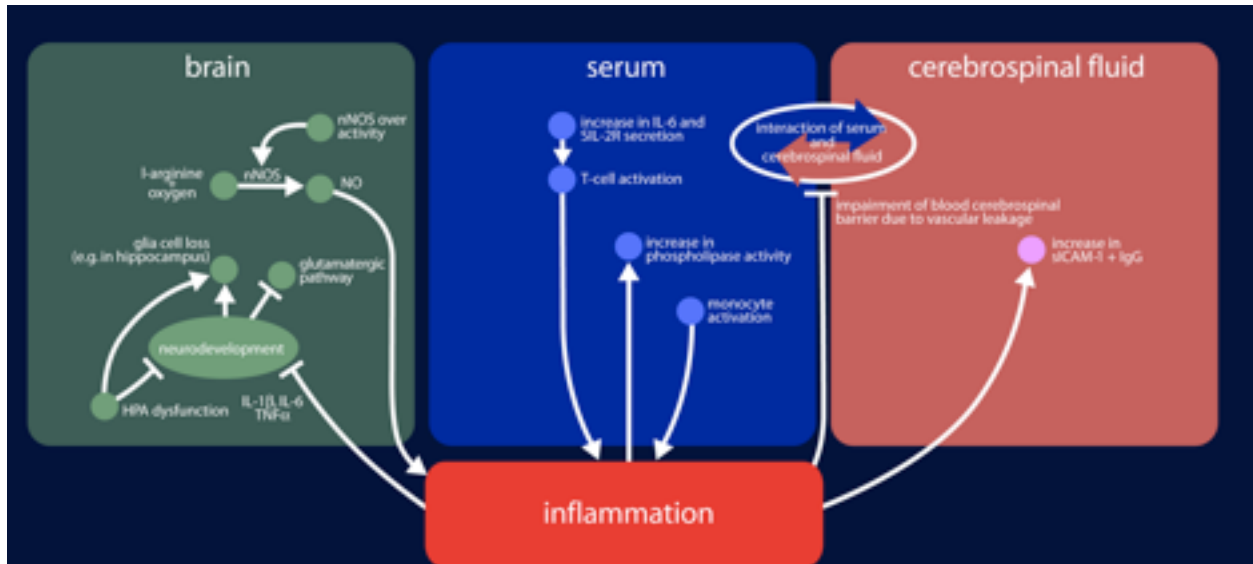
A amantadina mostra-se, neste contexto, um fármaco de propriedades compatíveis com este novo entendimento da esquizofrenia. Sua ação nos sistemas serotoninérgicos, dopaminérgicos, noradrenérgicos, glutamatérgico e por fim na regulação da micróglia mostra sua capacidade de agir em diferentes perfis e fases da doença, contribuindo tanto para o esbatimento de sintomas residuais, como para o prevenção da morte neuronal.

Como perspectivas futuras deste estudo, fica a utilização e seguimento da amantadina em pacientes em alto risco para desenvolvimento de esquizofrenia, o teste em diferentes doses em outros modelos animais para aventar a utilização de doses

superiores com segurança e a realização de um ensaio clínico duplo-cego (em realização) para consolidar esta nova terapêutica.

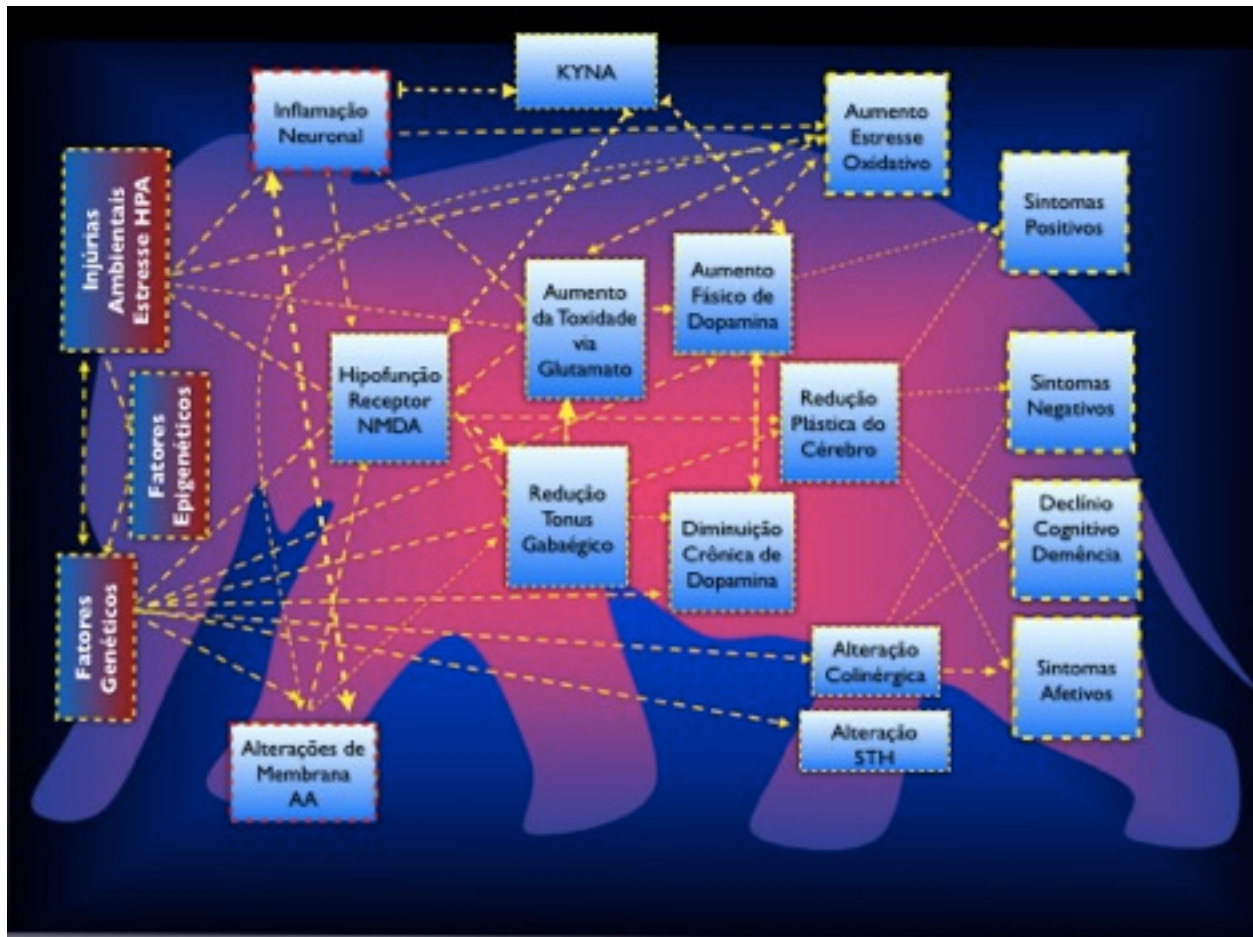
8. Anexos

Anexo 1.



Adaptado de Nature Review - Direitos Reservados.

Anexo 2.



Modelo integrador fisiopatológico da Esquizofrenia (Adaptado de Tandon 2012)

Anexo 3.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PACIENTES

Número do estudo:

Nome do sujeito:

Data de nascimento:

Cód. de identidade do sujeito:

Médico supervisor:

Informações sobre o estudo ao paciente

Gostaríamos de convidar o Sr./Sra a ler este termo e, se for do seu consentimento, participar neste estudo.

Esta folha informativa tem o objetivo de fornecer a informação mínima para quem considerar participar neste estudo. Ela não elimina a necessidade do pesquisador de explicar, e se necessário, ampliar as informações nela contidas.

Antes de participar deste estudo, gostaríamos que você tomasse conhecimento do que ele envolve. Damos abaixo alguns esclarecimentos sobre dúvidas que você possa ter. Em caso de qualquer dúvida quanto ao estudo, o que ele envolve e sobre os seus direitos, você deverá contatar a Dra. Clarissa Severino Gama pelo telefone (51) 3359-8845 (Pesquisadora Responsável).

Qual é o objetivo da pesquisa?

Com este estudo buscamos identificar se a amantadina quando usada juntamente com o tratamento habitual que o Sr./Sra está recebendo, traz benefícios no tratamento da esquizofrenia. Caso haja esta relação, esta substância poderá ser útil para ajudar no tratamento desta doença.

Quais são os riscos em participar?

A amantadina já é uma medicação comercializada no Brasil. As indicações atuais do seu uso são quadros de demências (Alzheimer, vascular, Wernick-Korsakoff). Não existem relatos de prejuízo com o uso juntamente com clozapina e/ou amantadina. Os efeitos colaterais mais comuns causados pela amantadina são tontura, dor de cabeça e cansaço. Existe o risco da punção venosa, que é um procedimento corriqueiro e de baixíssimo risco. Os riscos da punção venosa são um mal-estar passageiro ou mancha roxa no local da coleta de sangue. Serão retirados 10 ml de sangue, o que não compromete a saúde do paciente. O procedimento será feito com material esterilizado e descartável por profissionais da área de saúde com competência técnica para tal. Não será feita nenhuma alteração na medicação em uso pelo paciente.

Itens importantes

Você tem a liberdade de desistir do estudo a qualquer momento, sem fornecer um motivo, assim como pedir maiores informações sobre o estudo e o procedimento a ser feito.

O que eu ganho com este estudo?

Sua colaboração neste estudo visa aumentar o conhecimento científico sobre o tratamento da esquizofrenia. Caso os resultados do estudo sejam positivos, em curto prazo você poderá dispor deste tratamento, pois a amantadina já é comercializada no Brasil.

Como será o estudo?

Caso você concorde em participar do estudo, além do tratamento usual que está recebendo agora, haverá a possibilidade de receber a medicação amantadina ou uma substância inativa (placebo). A sua chance de receber amantadina ou placebo será feita por sorteio, sendo que cada participante tem igual chance de receber um ou outro (50%). O seu tratamento atual não será modificado. Não há necessidade de interrupção do tratamento para esquizofrenia ou qualquer outra medicação. O número de consultas não será alterado, e o tratamento seguirá normalmente. Em algumas consultas – a cada 4 semanas aproximadamente – você deverá responder a algumas perguntas a fim de avaliar o tratamento. O tempo total de duração do estudo é de 12 semanas.

Quais são os meus direitos?

Os pesquisadores do Serviço de Psiquiatria e os representantes da Comissão de Ética do HCPA podem necessitar examinar os seus registros a fim de verificar as informações para o objetivo deste estudo. No entanto, os seus registros médicos serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados deste estudo poderão ser publicados em jornais científicos ou submetidos à autoridade de medicamento competente, mas você não será identificado por nome. Sua participação neste estudo é voluntária, de forma que caso você decida não participar, isso não afetará o tratamento normal ao qual você tem direito.

DECLARAÇÃO:

Eu,declaro que:

Concordo total e voluntariamente em fazer parte deste estudo.

Recebi uma explicação completa do objetivo do estudo, dos procedimentos envolvidos e o que se espera de mim. O médico me explicou os possíveis problemas que podem surgir em consequência da minha participação neste estudo.

Informei o médico sobre medicamentos que estou tomando.

Concordo em cooperar inteiramente com o médico supervisor.

Estou ciente de que tenho total liberdade de desistir do estudo a qualquer momento e que esta desistência não irá, de forma alguma, afetar meu tratamento ou administração médica futura.

Estou ciente de que a informação nos meus registros médicos é essencial para a avaliação dos resultados do estudo. Concordo em liberar esta informação sob o entendimento de que ela será tratada confidencialmente.

Estou ciente de que não serei referido por nome em qualquer relatório relacionado a este estudo. Da minha parte, não devo restringir, de forma alguma, os resultados que possam surgir neste estudo.

Assinatura do Paciente

Ass: _____

Data:

Assinatura do Pesquisador Responsável:

Ass: _____

Data:

Assinatura do Familiar Responsável pelo Paciente

Ass: _____

Data:

Síntese de Adamantanos.

Anexo 4

Dicionário Farmacêutico

SYMMETREL®

(Amantadine Hydrochloride, USP) Tablets and Syrup

SYMMETREL (Amantadine Hydrochloride, USP) is designated generically as amantadine hydrochloride and chemically as 1-adamantanamine hydrochloride.

NH₂
• HCl

Amantadine hydrochloride is a stable white or nearly white crystalline powder, freely soluble in water and soluble in alcohol and in chloroform.

Amantadine hydrochloride has pharmacological actions as both an anti-Parkinson and an antiviral drug.

SYMMETREL is available in tablets and syrup.

Each tablet intended for oral administration contains 100 mg amantadine hydrochloride and has the following inactive ingredients: hydroxypropyl methylcellulose, magnesium stearate, microcrystalline cellulose, sodium starch glycolate, FD&C Yellow No. 6.

SYMMETREL syrup contains 50 mg of amantadine hydrochloride per 5 mL and has the following inactive ingredients: artificial raspberry flavor, citric acid, methylparaben, propylparaben, and sorbitol solution.

CLINICAL PHARMACOLOGY Pharmacodynamics Mechanism of Action: Antiviral

The mechanism by which amantadine exerts its antiviral activity is not clearly understood. It appears to mainly prevent the release of infectious viral nucleic acid into the host cell by interfering with the function of the transmembrane domain of the viral M2 protein. In certain cases, amantadine is also known to prevent virus assembly during virus replication. It does not appear to interfere with the immunogenicity of inactivated influenza A virus vaccine.

Antiviral Activity

Amantadine inhibits the replication of influenza A virus isolates from each of the subtypes, i.e., H1N1, H2N2 and H3N2. It has very little or no activity against influenza B virus isolates. A quantitative relationship between the *in vitro* susceptibility of influenza A virus to amantadine and the clinical response to therapy has not been established in man. Sensitivity test results, expressed as the concentration of amantadine required to inhibit by 50% the growth of virus (ED₅₀) in tissue culture vary greatly (from 0.1 µg/mL to 25.0 µg/mL) depending upon the assay protocol used, size of virus inoculum, isolates of influenza A virus strains tested, and the cell type used. Host cells in tissue culture readily tolerated amantadine up to a concentration of

100 µg/mL.

Drug Resistance

Influenza A variants with reduced *in vitro* sensitivity to amantadine have been isolated from epidemic strains in areas where adamantane derivatives are being used. Influenza viruses with reduced *in vitro* sensitivity have been shown to be transmissible and to cause typical influenza illness. The quantitative relationship between the *in vitro* sensitivity of influenza A variants to amantadine and the clinical response to therapy has not been established.

Mechanism of Action: Parkinson's Disease

The mechanism of action of amantadine in the treatment of Parkinson's disease and drug- induced extrapyramidal reactions is not known. Data from earlier animal studies suggest that SYMMETREL may have direct and indirect effects on dopamine neurons. More recent studies have demonstrated that amantadine is a weak, non-competitive NMDA receptor antagonist ($K_i = 10\mu\text{M}$). Although amantadine has not been shown to possess direct anticholinergic activity in animal studies, clinically, it exhibits anticholinergic-like side effects such as dry mouth, urinary retention, and constipation.

Pharmacokinetics

SYMMETREL is well absorbed orally. Maximum plasma concentrations are directly related to dose for doses up to 200 mg/day. Doses above 200 mg/day may result in a greater than proportional increase in maximum plasma concentrations. It is primarily excreted unchanged in the urine by glomerular filtration and tubular secretion. Eight metabolites of amantadine have been identified in human urine. One metabolite, an N-acetylated compound, was quantified in human urine and accounted for 5-15% of the administered dose. Plasma acetylamantadine accounted for up to 80% of the concurrent amantadine plasma concentration in 5 of 12 healthy volunteers following the ingestion of a 200 mg dose of amantadine. Acetylamantadine was not detected in the plasma of the remaining seven volunteers. The contribution of this metabolite to efficacy or toxicity is not known.

There appears to be a relationship between plasma amantadine concentrations and toxicity. As concentration increases, toxicity seems to be more prevalent, however, absolute values of amantadine concentrations associated with adverse effects have not been fully defined.

Amantadine pharmacokinetics were determined in 24 normal adult male volunteers after the oral administration of a single amantadine hydrochloride 100 mg soft gel capsule. The mean \pm SD maximum plasma concentration was $0.22 \pm 0.03 \mu\text{g/mL}$ (range: 0.18 to 0.32 $\mu\text{g/mL}$). The time to peak concentration was 3.3 ± 1.5 hours (range: 1.5 to 8.0 hours). The apparent oral clearance was $0.28 \pm 0.11 \text{ L/hr/kg}$ (range: 0.14 to 0.62 L/hr/kg). The half-life was 17 ± 4 hours (range: 10 to 25 hours). Across other studies, amantadine plasma half-life has averaged 16 ± 6 hours (range: 9 to 31 hours) in 19 healthy volunteers.

After oral administration of a single dose of 100 mg amantadine syrup to five healthy volunteers, the mean \pm SD maximum plasma concentration C_{max} was $0.24 \pm 0.04 \mu\text{g/mL}$ and ranged from 0.18 to 0.28 $\mu\text{g/mL}$. After 15 days of amantadine 100 mg b.i.d., the C_{max} was $0.47 \pm 0.11 \mu\text{g/mL}$ in four of the five volunteers. The administration of amantadine tablets as a 200 mg single dose to 6 healthy subjects resulted in a C_{max} of $0.51 \pm 0.14 \mu\text{g/mL}$. Across studies, the time to C_{max} (T_{max}) averaged about 2 to 4 hours.

Plasma amantadine clearance ranged from 0.2 to 0.3 L/hr/kg after the administration of 5 mg to 25 mg intravenous doses of amantadine to 15 healthy volunteers.

In six healthy volunteers, the ratio of amantadine renal clearance to apparent oral plasma clearance was 0.79 ± 0.17 (mean \pm SD).

The volume of distribution determined after the intravenous administration of amantadine to 15 healthy subjects was 3 to 8 L/kg , suggesting tissue binding. Amantadine, after single oral 200 mg doses to 6 healthy young subjects and to 6 healthy elderly subjects has been found in nasal mucus at mean \pm SD concentrations of 0.15 ± 0.16 , 0.28 ± 0.26 , and $0.39 \pm 0.34 \mu\text{g/g}$ at 1, 4, and 8 hours after dosing, respectively. These concentrations represented $31 \pm 33\%$, $59 \pm 61\%$, and $95 \pm 86\%$ of the corresponding plasma amantadine concentrations. Amantadine is approximately 67% bound to plasma proteins over a concentration range of 0.1 to 2.0 $\mu\text{g/mL}$. Following the administration of amantadine 100 mg as a single

dose, the mean \pm SD red blood cell to plasma ratio ranged from 2.7 ± 0.5 in 6 healthy subjects to 1.4 ± 0.2 in 8 patients with renal insufficiency.

The apparent oral plasma clearance of amantadine is reduced and the plasma half-life and plasma concentrations are increased in healthy elderly individuals age 60 and older. After single dose administration of 25 to 75 mg to 7 healthy, elderly male volunteers, the apparent plasma clearance of amantadine was 0.10 ± 0.04 L/hr/kg (range 0.06 to 0.17 L/hr/kg) and the half-life was 29 ± 7 hours (range 20 to 41 hours). Whether these changes are due to decline in renal function or other age related factors is not known.

In a study of young healthy subjects (n=20), mean renal clearance of amantadine, normalized for body mass index, was 1.5 fold higher in males compared to females (p<0.032).

Compared with otherwise healthy adult individuals, the clearance of amantadine is significantly reduced in adult patients with renal insufficiency. The elimination half-life increases two to three fold or greater when creatinine clearance is less than 40 mL/min/1.73 m² and averages eight days in patients on chronic maintenance hemodialysis. Amantadine is removed in negligible amounts by hemodialysis.

The pH of the urine has been reported to influence the excretion rate of SYMMETREL. Since the excretion rate of SYMMETREL increases rapidly when the urine is acidic, the administration of urine acidifying drugs may increase the elimination of the drug from the body.

INDICATIONS AND USAGE

SYMMETREL is indicated for the prophylaxis and treatment of signs and symptoms of infection caused by various strains of influenza A virus. SYMMETREL is also indicated in the treatment of parkinsonism and drug-induced extrapyramidal reactions.

Influenza A Prophylaxis

SYMMETREL (Amantadine Hydrochloride, USP) is indicated for chemoprophylaxis against signs and symptoms of influenza A virus infection when early vaccination is not feasible or when the vaccine is contraindicated or not available. In the prophylaxis of influenza, early vaccination on an annual basis as recommended by the Centers for Disease Control's Immunization Practices Advisory Committee is the method of choice. Because SYMMETREL does not completely prevent the host immune response to influenza A infection, individuals who take this drug may still develop immune responses to natural disease or vaccination and may be protected when later exposed to antigenically related viruses. Following vaccination during an influenza A outbreak, SYMMETREL prophylaxis should be considered for the 2- to 4-week time period required to develop an antibody response.

Influenza A Treatment

SYMMETREL is also indicated in the treatment of uncomplicated respiratory tract illness caused by influenza A virus strains especially when administered early in the course of illness. There are no well-controlled clinical studies demonstrating that treatment with SYMMETREL will avoid the development of influenza A virus pneumonitis or other complications in high risk patients.

There is no clinical evidence indicating that SYMMETREL is effective in the prophylaxis or treatment of viral respiratory tract illnesses other than those caused by influenza A virus strains.

Parkinson's Disease/Syndrome

SYMMETREL is indicated in the treatment of idiopathic Parkinson's disease (Paralysis Agitans), postencephalitic parkinsonism, and symptomatic parkinsonism which may follow injury to the nervous system by carbon monoxide intoxication. It is indicated in those elderly patients believed to develop parkinsonism in association with cerebral arteriosclerosis. In the treatment of Parkinson's disease,

SYMMETREL is less effective than levodopa, (-)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-L-alanine, and its efficacy in comparison with the anticholinergic antiparkinson drugs has not yet been established.

Drug-Induced Extrapyrmidal Reactions

SYMMETREL is indicated in the treatment of drug-induced extrapyramidal reactions. Although anticholinergic-type side effects have been noted with SYMMETREL when used in patients with drug-induced extrapyramidal reactions, there is a lower incidence of these side effects than that observed with the anticholinergic antiparkinson drugs.

CONTRAINDICATIONS

SYMMETREL is contraindicated in patients with known hypersensitivity to amantadine hydrochloride or to any of the other ingredients in SYMMETREL.

WARNINGS

Deaths

Deaths have been reported from overdose with SYMMETREL. The lowest reported acute lethal dose was 1 gram. Acute toxicity may be attributable to the anticholinergic effects of amantadine. Drug overdose has resulted in cardiac, respiratory, renal or central nervous system toxicity. Cardiac dysfunction includes arrhythmia, tachycardia and hypertension (see OVERDOSAGE).

Suicide Attempts

Suicide attempts, some of which have been fatal, have been reported in patients treated with SYMMETREL, many of whom received short courses for influenza treatment or prophylaxis. The incidence of suicide attempts is not known and the pathophysiologic mechanism is not understood. Suicide attempts and suicidal ideation have been reported in patients with and without prior history of psychiatric illness. SYMMETREL can exacerbate mental problems in patients with a history of psychiatric disorders or substance abuse. Patients who attempt suicide may exhibit abnormal mental states which include disorientation, confusion, depression, personality changes, agitation, aggressive behavior, hallucinations, paranoia, other psychotic reactions, and somnolence or insomnia. Because of the possibility of serious adverse effects, caution should be observed when prescribing SYMMETREL to patients being treated with drugs having CNS effects, or for whom the potential risks outweigh the benefit of treatment.

CNS Effects

Patients with a history of epilepsy or other "seizures" should be observed closely for possible increased seizure activity.

Patients receiving SYMMETREL who note central nervous system effects or blurring of vision should be cautioned against driving or working in situations where alertness and adequate motor coordination are important.

Other

Patients with a history of congestive heart failure or peripheral edema should be followed closely as there are patients who developed congestive heart failure while receiving SYMMETREL.

Patients with Parkinson's disease improving on SYMMETREL should resume normal activities gradually and cautiously, consistent with other medical considerations, such as the presence of osteoporosis or phlebothrombosis.

Because SYMMETREL has anticholinergic effects and may cause mydriasis, it should not be given to patients with untreated angle closure glaucoma.

PRECAUTIONS

SYMMETREL should not be discontinued abruptly in patients with Parkinson's disease since a few patients have experienced a parkinsonian crisis, i.e., a sudden marked clinical deterioration, when this medication was suddenly stopped. The dose of anticholinergic drugs or of SYMMETREL should be reduced if atropine-like effects appear when these drugs are used concurrently. Abrupt discontinuation may also precipitate delirium, agitation, delusions, hallucinations, paranoid reaction, stupor, anxiety, depression and slurred speech.

Neuroleptic Malignant Syndrome (NMS)

Sporadic cases of possible Neuroleptic Malignant Syndrome (NMS) have been reported in association with dose reduction or withdrawal of SYMMETREL therapy. Therefore, patients should be observed carefully when the dosage of SYMMETREL is reduced abruptly or discontinued, especially if the patient is receiving neuroleptics.

NMS is an uncommon but life-threatening syndrome characterized by fever or hyperthermia; neurologic findings including muscle rigidity, involuntary movements, altered consciousness; mental status changes; other disturbances such as autonomic dysfunction, tachycardia, tachypnea, hyper- or hypotension; laboratory findings such as creatine phosphokinase elevation, leukocytosis, myoglobinuria, and increased serum myoglobin.

The early diagnosis of this condition is important for the appropriate management of these patients. Considering NMS as a possible diagnosis and ruling out other acute illnesses (e.g., pneumonia, systemic infection, etc.) is essential. This may be especially complex if the clinical presentation includes both serious medical illness and untreated or inadequately treated extrapyramidal signs and symptoms (EPS). Other important considerations in the differential diagnosis include central anticholinergic toxicity, heat stroke, drug fever and primary central nervous system (CNS) pathology.

The management of NMS should include: 1) intensive symptomatic treatment and medical monitoring, and 2) treatment of any concomitant serious medical problems for which specific treatments are available. Dopamine agonists, such as bromocriptine, and muscle relaxants, such as dantrolene are often used in the treatment of NMS, however, their effectiveness has not been demonstrated in controlled studies.

Renal disease

Because SYMMETREL is mainly excreted in the urine, it accumulates in the plasma and in the body when renal function declines. Thus, the dose of SYMMETREL should be reduced in patients with renal impairment and in individuals who are 65 years of age or older (see DOSAGE AND ADMINISTRATION; Dosage for Impaired Renal Function).

Liver disease

Care should be exercised when administering SYMMETREL to patients with liver disease. Rare instances of reversible elevation of liver enzymes have been reported in patients receiving SYMMETREL, though a specific relationship between the drug and such changes has not been established.

Melanoma

Epidemiological studies have shown that patients with Parkinson's disease have a higher risk (2- to approximately 6-fold higher) of developing melanoma than the general population. Whether the increased risk observed was due to Parkinson's disease or other factors, such as drugs used to treat Parkinson's disease, is unclear.

For the reasons stated above, patients and providers are advised to monitor for melanomas frequently and on a regular basis when using SYMMETREL for *any* indication. Ideally, periodic skin examinations should be performed by appropriately qualified individuals (e.g., dermatologists).

Other

The dose of SYMMETREL may need careful adjustment in patients with congestive heart failure, peripheral edema, or orthostatic hypotension. Care should be exercised when administering SYMMETREL to patients with a history of recurrent eczematoid rash, or to patients with psychosis or severe psychoneurosis not controlled by chemotherapeutic agents.

Serious bacterial infections may begin with influenza-like symptoms or may coexist with or occur as complications during the course of influenza. SYMMETREL has not been shown to prevent such complications.

Information for Patients

Patients should be advised of the following information:

Blurry vision and/or impaired mental acuity may occur.

Gradually increase physical activity as the symptoms of Parkinson's disease improve.

Avoid excessive alcohol usage, since it may increase the potential for CNS effects such as dizziness, confusion, lightheadedness and orthostatic hypotension.

Avoid getting up suddenly from a sitting or lying position. If dizziness or lightheadedness occurs, notify physician.

Notify physician if mood/mental changes, swelling of extremities, difficulty urinating and/or shortness of breath occur.

Do not take more medication than prescribed because of the risk of overdose. If there is no improvement in a few days, or if medication appears less effective after a few weeks, discuss with a physician.

Consult physician before discontinuing medication.

Seek medical attention immediately if it is suspected that an overdose of medication has been taken.

There have been reports of patients experiencing intense urges to gamble, increased sexual urges, and other intense urges while taking one or more of the medications generally used for the treatment of Parkinson's disease, including SYMMETREL. Although it is not proven that the medications caused these events, these urges were reported to have stopped in some cases when the dose was reduced or the medication was stopped. Prescribers should ask patients about the development of new or increased gambling urges, sexual urges or other urges while being treated with SYMMETREL. Patients should inform their physician if they experience new or increased gambling urges, increased sexual urges or other intense urges while taking SYMMETREL. Physicians should consider dose reduction or stopping the medication if a patient develops such urges while taking SYMMETREL.

Drug Interactions

Careful observation is required when SYMMETREL is administered concurrently with central nervous system stimulants.

Agents with anticholinergic properties may potentiate the anticholinergic-like side effects of amantadine.

Coadministration of thioridazine has been reported to worsen the tremor in elderly patients with Parkinson's disease, however, it is not known if other phenothiazines produce a similar response. Coadministration of Dyazide (triamterene/hydrochlorothiazide) resulted in a higher plasma amantadine concentration in a 61-year-old man receiving SYMMETREL (Amantadine Hydrochloride, USP) 100 mg TID for Parkinson's disease.¹ It is not known which of the components of Dyazide contributed to the observation or if related drugs produce a similar response.

Coadministration of quinine or quinidine with amantadine was shown to reduce the renal clearance of amantadine by about 30%.

The concurrent use of SYMMETREL with live attenuated influenza vaccine (LAIV) intranasal has not been evaluated. However, because of the potential for interference between these products, LAIV should not be administered within 2 weeks before or 48 hours after administration of SYMMETREL, unless medically indicated. The concern about possible interference arises from the potential for antiviral drugs to inhibit replication of live vaccine virus. Trivalent inactivated influenza vaccine can be administered at any time relative to use of SYMMETREL.

Carcinogenesis and Mutagenesis

Long-term *in vivo* animal studies designed to evaluate the carcinogenic potential of SYMMETREL have not been performed. In several *in vitro* assays for gene mutation, SYMMETREL did not increase the number of spontaneously observed mutations in four strains of *Salmonella typhimurium* (Ames Test) or in a mammalian cell line (Chinese Hamster Ovary cells) when incubations were performed either with or without a liver metabolic activation extract. Further, there was no evidence of chromosome damage observed in an *in vitro* test using freshly derived and stimulated human peripheral blood lymphocytes (with and without metabolic activation) or in an *in vivo* mouse bone marrow micronucleus test (140-550 mg/kg; estimated human equivalent doses of 11.7-45.8 mg/kg based on body surface area conversion).

Impairment of Fertility

The effect of amantadine on fertility has not been adequately tested, that is, in a study conducted under Good Laboratory Practice (GLP) and according to current recommended methodology. In a three litter, non-GLP, reproduction study in rats, Symmetrel at a dose of 32 mg/kg/day (equal to the maximum recommended human dose on a mg/m² basis) administered to both males and females slightly impaired fertility. There were no effects on fertility at a dose level of 10 mg/kg/day (or 0.3 times the maximum recommended human dose on a mg/m² basis); intermediate doses were not tested.

Failed fertility has been reported during human *in vitro* fertilization (IVF) when the sperm donor ingested amantadine 2 weeks prior to, and during the IVF cycle.

Pregnancy Category C

The effect of amantadine on embryofetal and peri-postnatal development has not been adequately tested, that is, in studies conducted under Good Laboratory Practice (GLP) and according to current recommended methodology. However, in two non-GLP studies in rats in which females were dosed from 5 days prior to mating to Day 6 of gestation or on Days 7-14 of gestation, Symmetrel produced increases in embryonic death at an oral dose of 100 mg/kg (or 3 times the maximum recommended human dose on a mg/m² basis). In the non-GLP rat study in which females were dosed on Days 7-14 of gestation, there was a marked increase in severe visceral and skeletal malformations at oral doses of 50 and 100 mg/kg (or 1.5 and 3 times, respectively, the maximum recommended human dose on a mg/m² basis). The no-effect dose for teratogenicity was 37 mg/kg (equal to the maximum recommended human dose on a mg/m² basis). The safety margins reported may not accurately reflect the risk considering the questionable quality of the study on which they are based. There are no adequate and well-controlled studies in pregnant women. Human data regarding teratogenicity after maternal use of amantadine is scarce. Tetralogy of Fallot and tibial hemimelia (normal karyotype) occurred in an infant exposed to amantadine during the first trimester of pregnancy (100 mg P.O. for 7 days during the 6th and 7th week of gestation). Cardiovascular maldevelopment (single ventricle with pulmonary atresia) was associated with maternal exposure to amantadine (100 mg/d) administered during the first 2 weeks of pregnancy. SYMMETREL

should be used during pregnancy only if the potential benefit justifies the potential risk to the embryo or fetus.

Nursing Mothers

SYMMETREL is excreted in human milk. Use is not recommended in nursing mothers.

Pediatric Use

The safety and efficacy of SYMMETREL in newborn infants and infants below the age of 1 year have not been established.

Usage in the Elderly

Because SYMMETREL is primarily excreted in the urine, it accumulates in the plasma and in the body when renal function declines. Thus, the dose of SYMMETREL should be reduced in patients with renal impairment and in individuals who are 65 years of age or older. The dose of SYMMETREL may need reduction in patients with congestive heart failure, peripheral edema, or orthostatic hypotension (see DOSAGE AND ADMINISTRATION).

ADVERSE REACTIONS

The adverse reactions reported most frequently at the recommended dose of SYMMETREL (5- 10%) are: nausea, dizziness (lightheadedness), and insomnia.

Less frequently (1-5%) reported adverse reactions are: depression, anxiety and irritability, hallucinations, confusion, anorexia, dry mouth, constipation, ataxia, livedo reticularis, peripheral edema, orthostatic hypotension, headache, somnolence, nervousness, dream abnormality, agitation, dry nose, diarrhea and fatigue.

Infrequently (0.1-1%) occurring adverse reactions are: congestive heart failure, psychosis, urinary retention, dyspnea, skin rash, vomiting, weakness, slurred speech, euphoria, thinking abnormality, amnesia, hyperkinesia, hypertension, decreased libido, and visual disturbance, including punctate subepithelial or other corneal opacity, corneal edema, decreased visual acuity, sensitivity to light, and optic nerve palsy.

Rare (less than 0.1%) occurring adverse reactions are: instances of convulsion, leukopenia, neutropenia, eczematoid dermatitis, oculogyric episodes, suicidal attempt, suicide, and suicidal ideation (see WARNINGS).

Other adverse reactions reported during postmarketing experience with SYMMETREL usage include:

Nervous System/Psychiatric

coma, stupor, delirium, hypokinesia, hypertonia, delusions, aggressive behavior, paranoid reaction, manic reaction, involuntary muscle contractions, gait abnormalities, paresthesia, EEG changes, and tremor. Abrupt discontinuation may also precipitate delirium, agitation, delusions, hallucinations, paranoid reaction, stupor, anxiety, depression and slurred speech;

Cardiovascular

cardiac arrest, arrhythmias including malignant arrhythmias, hypotension, and tachycardia;

Respiratory

acute respiratory failure, pulmonary edema, and tachypnea;

Gastrointestinal

dysphagia;

Hematologic

leukocytosis; agranulocytosis

Special Senses

keratitis and mydriasis;

Skin and Appendages

pruritus and diaphoresis;

Miscellaneous

neuroleptic malignant syndrome (see WARNINGS), allergic reactions including anaphylactic reactions, edema, and fever;

Laboratory Test

elevated: CPK, BUN, serum creatinine, alkaline phosphatase, LDH, bilirubin, GGT, SGOT, and SGPT.

OVERDOSAGE

Deaths have been reported from overdose with SYMMETREL. The lowest reported acute lethal dose was 1 gram. Because some patients have attempted suicide by overdosing with amantadine, prescriptions should be written for the smallest quantity consistent with good patient management.

Acute toxicity may be attributable to the anticholinergic effects of amantadine. Drug overdose has resulted in cardiac, respiratory, renal or central nervous system toxicity. Cardiac dysfunction includes arrhythmia, tachycardia and hypertension. Pulmonary edema and respiratory distress (including adult respiratory distress syndrome - ARDS) have been reported; renal dysfunction including increased BUN, decreased creatinine clearance and renal insufficiency can occur. Central nervous system effects that have been reported include insomnia, anxiety, agitation, aggressive behavior, hypertonia, hyperkinesia, ataxia, gait abnormality, tremor, confusion, disorientation, depersonalization, fear, delirium, hallucinations, psychotic reactions, lethargy, somnolence and coma. Seizures may be exacerbated in patients with prior history of seizure disorders. Hyperthermia has also been observed in cases where a drug overdose has occurred.

There is no specific antidote for an overdose of SYMMETREL. However, slowly administered intravenous physostigmine in 1 and 2 mg doses in an adult² at 1- to 2-hour intervals and 0.5 mg doses in a child³ at 5- to 10-minute intervals up to a maximum of 2 mg/hour have been reported to be effective in the control of central nervous system toxicity caused by amantadine hydrochloride. For acute overdosing, general supportive measures should be employed along with immediate gastric lavage or induction of emesis. Fluids should be forced, and if necessary, given intravenously. The pH of the urine has been reported to influence the excretion rate of SYMMETREL. Since the excretion rate of SYMMETREL increases rapidly when the urine is acidic, the administration of urine acidifying drugs may increase the elimination of the drug from the body. The blood pressure, pulse, respiration and temperature should be monitored. The patient should be observed for hyperactivity and convulsions; if required, sedation, and anticonvulsant therapy should be administered. The patient should be observed for the possible development of arrhythmias and hypotension; if required, appropriate antiarrhythmic and antihypotensive therapy should be given. Electrocardiographic monitoring may be required after ingestion, since malignant tachyarrhythmias can appear after overdose.

Care should be exercised when administering adrenergic agents, such as isoproterenol, to patients with a SYMMETREL overdose, since the dopaminergic activity of SYMMETREL has been reported to induce malignant arrhythmias.

The blood electrolytes, urine pH and urinary output should be monitored. If there is no record of recent voiding, catheterization should be done.

REFERENCES

Wilson and A.H. Rajput, Amantadine-Dyazide Interaction, *Can. Med. Assoc. J.* 129:974- 975, 1983.

Casey, *N. Engl. J. Med.* 298:516, 1978.

Berkowitz, *J. Pediatr.* 95:144, 1979.

Manufactured for:

Endo Pharmaceuticals Inc.



Chadds Ford, PA 19317

SYMMETREL® is a Registered Trademark of Endo Pharmaceuticals Inc.

Copyright © Endo Pharmaceuticals Inc. 2007

Anexo 5

