

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Faculdade de Biociências
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

GUSTAVO PIMENTEL DUTRA

**ESTUDO ASSOCIATIVO ENTRE A ESQUIZOFRENIA E O
POLIMORFISMO G22A NO GENE DA ADENOSINA DEAMINASE (ADA)**

Porto Alegre/2008

GUSTAVO PIMENTEL DUTRA
(Farmacêutico-Bioquímico)

**ESTUDO ASSOCIATIVO ENTRE A ESQUIZOFRENIA E O
POLIMORFISMO G22A NO GENE DA ADENOSINA DEAMINASE (ADA)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, da Faculdade de Biociências, da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular, sob a orientação do Dr. Maurício Reis Bogo e a co-orientação do Dr. Diogo Rizzato Lara.

Porto Alegre (RS)
Maio de 2008



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA
DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE BIOCÊNCIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR

**ESTUDO ASSOCIATIVO ENTRE A ESQUIZOFRENIA E O
POLIMORFISMO G22A NO GENE DA ADENOSINA DEAMINASE (ADA)**

GUSTAVO PIMENTEL DUTRA

ORIENTADOR: MAURÍCIO REIS BOGO
CO-ORIENTADOR: DIOGO LARA

Porto Alegre (RS)
Maio de 2008

AGRADECIMENTOS

Aos Doutores Diogo Rizzato Lara e Maurício Reis Bogo pela qualificada e presente orientação desta dissertação.

Aos demais professores e funcionários da Faculdade de Biociências da PUCRS.

A todos os colegas do Centro de Biologia Genômica e Molecular pela ajuda oferecida para desenvolver este projeto.

A Josiane Brandinelli e a Doutora Jacqueline Piccolli pela contribuição no desenvolvimento das técnicas e cálculos estatísticos.

E aos meus Pais pela força, incentivo, compreensão e sacrifício despendidos em mais essa etapa da minha vida.

SUMÁRIO

1 REFERENCIAL TEÓRICO.....	9
1.1 Esquizofrenia.....	9
1.1.1 História.....	9
1.1.2 Características.....	10
1.1.3 Epidemiologia.....	11
1.1.4 Etiologia.....	12
1.1.4.1 Bases Biológicas.....	13
1.1.4.2 Neurodesenvolvimento.....	13
1.1.4.3 Genética.....	15
1.1.4.4 Fatores de risco psicossociais.....	16
1.1.5 Tratamento.....	17
1.2 Hipótese Purinérgica.....	18
1.2.1 Alopurinol e a Esquizofrenia.....	21
1.2.2 A adenosina no Neurodesenvolvimento.....	24
1.2.3 Adenosina Deaminase.....	27
1.3 Outros genes estudados na Esquizofrenia.....	29
1.4 OBJETIVOS.....	30
2 ARTIGO CIENTÍFICO.....	31

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	42
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44
ANEXOS.....	54

ESTUDO ASSOCIATIVO ENTRE A ESQUIZOFRENIA E O POLIMORFISMO G22A NO GENE DA ADENOSINA DEAMINASE (ADA)

Pós-graduando: Gustavo Pimentel Dutra

Orientador: Prof. Doutor Maurício Reis Bogo¹

Co-Orientador: Prof. Doutor Diogo Rizzato Lara¹

¹ Faculdade de Biociência da PUCRS

RESUMO

O sistema purinérgico, especialmente a adenosina, pode desempenhar um papel na patofisiologia da esquizofrenia. A ativação dos receptores de adenosina A1 inibe a liberação de vários neurotransmissores como o glutamato, a dopamina, a serotonina e a acetilcolina, e diminui a atividade neuronal pela hiperpolarização pós-sináptica. A adenosina (ADA) participa no metabolismo da adenosina convertendo-a em inosina. O polimorfismo funcional mais freqüente da ADA (22 G→A) (ADA1 *2) exibe 20-30% menos atividade enzimática em indivíduos com o genótipo G/A do que em indivíduos com o genótipo G/G. Esse polimorfismo foi avaliado em 152 pacientes esquizofrênicos e 111 controles saudáveis. Nós observamos uma diminuição significativa na freqüência do alelo de baixa atividade ADA1 *2 em pacientes esquizofrênicos (7 – 4,6%) em relação aos controles (13 – 17%, $p= 0,032$, OR= 2,6). Esses resultados sugerem que o alelo ADA1 *2 associado à baixa atividade da ADA, e conseqüentemente a altos níveis de adenosina, é menos freqüente entre os pacientes esquizofrênicos.

ABSTRACT

The purinergic system, especially adenosine, can play a role in the pathophysiology of schizophrenia. Activation of adenosine A1R inhibits the release of several neurotransmitters, such as glutamate, dopamine, serotonin and acetylcholine, and decreases neuronal activity by pos-synaptic hyperpolarization. Adenosine deaminase (ADA) participates in purine metabolism by converting adenosine into inosine. The most frequent functional polymorphism of ADA (22 G→A) (ADA1 *2) exhibits 20-30% lower enzymatic activity in individuals with the G/A genotype than individuals with the G/G genotype. We evaluated this polymorphism in 152 schizophrenic patients and 111 healthy controls. We observed a significant decrease in frequency of the low-activity ADA1 *2 allele in schizophrenic patients (7 – 4.6%) relative to controls (13 – 11.7%, $p= 0.032$, OR=2.6). These results suggest that ADA1 *2 allele associated with low ADA activity, and putatively with higher adenosine levels, is less frequent among schizophrenic patients.

1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 Esquizofrenia

A esquizofrenia pode ser vista como um dos principais transtornos psiquiátricos, considerando-se a gravidade de suas manifestações clínicas, a complexidade do tratamento e, sobretudo o impacto causado às famílias, à sociedade e aos próprios pacientes.

1.1.1 História

A definição atual da esquizofrenia deriva das observações clínicas do francês Benedict A. Morel (1809-1873), do alemão Emil Kraepelin (1856-1926) e do suíço Eugen Bleuler (1857-1939). Morel chamou de *démense précoce* (demência precoce) a deterioração mental ocorrida na adolescência. A principal contribuição de Kraepelin foi diferenciar a demência precoce de Morel da psicose maníaco-depressiva (atualmente chamada de transtorno bipolar), principalmente com relação ao curso, sendo o da primeira deteriorante e o da segunda

remitente. Contudo, foi dos trabalhos de Bleuler que se originou o termo esquizofrenia (do grego *skhízô* = divisão, cisma, fenda e *phrenós* = inteligência, pensamento, alma) utilizado para indicar a presença de uma cisão entre o pensamento, emoção e comportamento nos pacientes afetados ^{1,2 e 3}.

1.1.2 Características

Os indivíduos com esquizofrenia demonstram ampla gama de sintomas graves e incomuns. Na área cognitiva eles podem: a) ter crenças bizarras sobre quem eles são e o que está acontecendo com eles (delírios); b) apresentar um déficit sério em seu funcionamento intelectual e suas habilidades de comunicar-se (déficit cognitivo); c) ter alterações de sensopercepção, como ouvir, sentir, cheirar e ver coisas que os indivíduos normais não percebem (alucinações); d) ser incapazes de filtrar estimulações irrelevantes e assim sentir-se inundado com estímulos (sobrecarga sensorial). Em relação ao plano afetivo, suas respostas emocionais podem ser não-moduladas ou grosseiramente inapropriadas para a situação. Somaticamente os pacientes podem ficar hiperestimulados durante a fase aguda do transtorno mas apresentam estimulação normal ou baixa durante a fase crônica. Os sintomas motores podem variar de imobilidade prolongada à hiperatividade e agitação e em alguns casos podem demonstrar caretas e movimentos de dedos ou mão repetitivos ou estereotipados ^{4 e 6}.

As pessoas com esquizofrenia frequentemente passam por três fases: a fase prodrômica, na qual o transtorno se desenvolve; a fase ativa, na qual os sintomas são mais pronunciados e a fase residual, na qual os sintomas estão diminuídos ⁴.

Cinco tipos de esquizofrenia foram identificados: desorganizado, paranóide, indiferenciado, catatônico e residual. Em relação ao valor prático na resposta ao tratamento, o tipo paranóide responde melhor do que os tipos desorganizado e catatônico. No entanto, há alguma dúvida quanto a se eles são de fato tipos diferentes com causas diferentes ⁴.

Uma distinção foi feita entre os sintomas positivos (ex., alucinações, delírios, transtorno de pensamento) e sintomas negativos (ex., humor não modulado, pobreza de fala, apatia). Os sintomas negativos são observados com mais frequência em homens do que em mulheres e são mais estáveis do que os sintomas positivos ^{4 e 7}.

1.1.3 Epidemiologia

A esquizofrenia afeta entre 0,5 e 1,5% da população adulta mundial. A incidência é comparável em todas as sociedades, estando na faixa de 0,5 a 5 em cada 10.000 pessoas por ano ¹. Em estudo recente, que revisou publicações desde 1965 até 2002 de 46 países, concluiu-se que apesar de existir variações substanciais entre diversos locais, foi encontrada uma prevalência de esquizofrenia de 4 a 7 por 1,000 ⁵. Além disso, países em desenvolvimento têm uma baixa prevalência. Em relação à localização rural e urbana, a incidência de esquizofrenia na população urbana é mais alta. Nestes estudos também

foi comparada a prevalência desta doença entre os imigrantes e os nativos, sendo que foi encontrada uma maior prevalência entre os imigrantes ^{5 e 8}.

McGrath et al. (2005) não encontraram diferença significativa na prevalência da esquizofrenia entre homens e mulheres ($F_{1,72}=0.68$ e $p=0.41$) ⁵. Habitualmente, a esquizofrenia se manifesta durante a adolescência ou início da idade adulta (15-35 anos), com um pico de incidência mais precoce em homens, primeira admissão hospitalar em média aos 25 anos, do que em mulheres, que em média são internadas pela primeira vez aos 30 anos ^{6 e 9}.

1.1.4 Etiologia

Apesar da exata origem não estar concluída, as evidências indicam que a esquizofrenia é um severo transtorno do funcionamento cerebral. As atuais evidências relativas às causas da esquizofrenia são um mosaico: a única coisa clara é a constituição multifatorial da esquizofrenia. Isso inclui mudanças na química cerebral, alterações estruturais e ambientais. A origem viral e traumas encefálicos não estão descartados ¹⁰.

A busca da identificação dos fatores etiológicos envolve o estudo das bases biológicas, pesquisas genéticas e de neuroimagem e conhecimento dos fatores psicossociais.

1.1.4.1 Bases biológicas

Vários neurotransmissores têm sido investigados e relacionados à esquizofrenia, dentre eles a dopamina, a serotonina a noradrenalina e o ácido γ -amino-butírico (GABA).

A hipótese dopaminérgica evoluiu, em primeiro lugar, da observação de que drogas que elevam os níveis de dopamina, por exemplo, anfetamina e cocaína, podem causar psicose paranóide quase indistinta da esquizofrenia paranóide. Em segundo lugar, todos os anti-psicóticos capazes de tratar os sintomas psicóticos positivos são bloqueadores dopaminérgicos, particularmente dos receptores D2 localizados na via dopaminérgica mesolímbica, que se projeta da área tegmental ventral do mesencéfalo para o *nucleus accumbens*⁶.

A serotonina despertou grande interesse desde que se observou que os antipsicóticos atípicos (ex., clozapina e risperidona) têm potentes atividades serotoninérgicas. Especificamente, um antagonismo no receptor de serotonina tipo 2 tem sido relacionado à redução de sintomas, principalmente negativos, e prevenção contra o desenvolvimento de transtornos dos movimentos relacionados ao antagonismo D2¹.

1.1.4.2 Neurodesenvolvimento

Esta hipótese é baseada na demonstração de distúrbios de comportamento e cognitivos na infância e adolescência que são eventualmente diagnosticados em esquizofrênicos¹¹. A ausência de

marcadas mudanças neurodegenerativas em cérebros de esquizofrênicos junto com evidências sugestivas de mal-desenvolvimento cortical são consistentes com esta hipótese.

De acordo com esta hipótese, a etiologia da esquizofrenia pode envolver processos patológicos os quais iniciam *in útero* ou perinatal e continuam até o cérebro se aproximar de seu estado anatômico adulto resultando numa extensiva perda neuronal e poda sináptica durante o início e final da adolescência. Propõe-se que essas anormalidades no neurodesenvolvimento levam a ativação de circuitos neurais patológicos durante a adolescência ou início da fase adulta, talvez devido a estresse severo, desencadeando sintomas positivos, negativos ou ambos. O surgimento de evidências de mal-desenvolvimento cortical na esquizofrenia e o desenvolvimento de vários modelos animais, os quais são baseados em lesões neonatais que produzem anormalidades comportamentais ou sensibilidade alterada a drogas dopaminérgicas somente em animais adolescentes e adultos ¹², tem feito uma ligação entre o mal-desenvolvimento e a esquizofrenia mais sustentável.

Um achado consistente na esquizofrenia é o aumento ventricular cerebral ¹³. Um grande número de estudos com tomografia computadorizada e ressonância magnética indica aumento ventricular lateral e terceiro e uma dilatação das fissuras corticais e sulcos. Gêmeos monozigóticos (MZ) afetados com esquizofrenia possuem grandes ventrículos quando comparados com gêmeos não afetados. Estas descobertas não são específicas para a esquizofrenia, porém,

elas também são encontradas na mesma extensão em maníaco-depressivos.

1.1.4.3 Genética

A esquizofrenia possui um modo complexo de herança e variabilidade de expressão. Pesquisas com adoção, gêmeos e estudos de famílias por volta de 1960 estabeleceram que a vulnerabilidade para o desenvolvimento de esquizofrenia é em grande parte genético. O que é herdado é um aumento do risco de vir a desenvolver esquizofrenia ao invés de um gene ou genes que predizem a ocorrência da esquizofrenia. Assim, cerca de 50% de gêmeos monozigotos (MZ) são concordantes para esquizofrenia comparados com menos de 20% dos gêmeos dizigotos (DZ), usando psicose como fenótipo. Desta forma fica claro que o ambiente bem como os fatores genéticos são importantes no desenvolvimento desta desordem ¹⁴.

A alta taxa de discordância entre gêmeos MZ indica que o que é herdado é uma predisposição, mas não uma certeza de desenvolvimento da esquizofrenia. Parentes em primeiro grau apresentam uma chance de desenvolver esquizofrenia de cerca de 10% se um parente ou um irmão (ã) tem esquizofrenia e 45 a 50% para um filho (a) de dois pais esquizofrênicos. Em segundo e terceiro grau a chance cai para 3,3% e 2,4%, respectivamente. Além disso, estudos de adoção mostram uma prevalência de 9,4% em filhos adotados de pais esquizofrênicos e uma prevalência de 1,2% em adotados controle ¹⁴.

A distribuição da esquizofrenia nas famílias indica uma herança complexa já que o risco para parentes diminui acentuadamente conforme a distancia de parentesco. Estudos de extensas genealogias com esquizofrenias de diversas origens têm descartado a hipótese de um único gene dominante como causa da doença na maioria dos casos. Entretanto, pode haver uma pequena proporção de casos os quais um gene, agindo sozinho ou com outros múltiplos genes de pequena ação e fatores ambientais, que leva a vulnerabilidade de desenvolvimento da esquizofrenia. É provável que efeitos aditivos de vários genes de efeito modesto, chamado de *herança oligogênica*, ou muitos genes de efeito pequeno, chamado de *herança poligênica*, sejam a base para a vulnerabilidade ¹⁵.

1.1.4.4 Fatores de risco psicossociais

Processos sociais potencialmente desorganizadores, tais como rápida urbanização e industrialização assim como mudanças econômicas e sociais profundas, parecem estar ligados ao maior risco de desenvolvimento de esquizofrenia, principalmente ao momento de início e severidade da doença. Outros possíveis fatores de risco são os microsociais, tais como processos familiares ¹ e uso de substâncias psicoativas, como a maconha ¹⁶.

1.1.5 Tratamento

O tratamento que oferece melhores resultados baseia-se na utilização de medicamentos associados a medidas psicossociais como, por exemplo, psicoterapia, terapia ocupacional e grupos terapêuticos.

No entanto, o uso de antipsicóticos é parcialmente eficaz, mas indispensável no tratamento em todas as fases da esquizofrenia, tanto na aguda quanto no período de manutenção, apesar de não ser curativa.

O tratamento da esquizofrenia com os antipsicóticos convencionais melhora o quadro de 60% a 80% dos pacientes. Entretanto, um percentual expressivo destes pacientes, 20% a 40%, não respondem a estes antipsicóticos, mesmo em doses elevadas sendo considerados um “grupo de pacientes ‘resistentes’ à terapia neuroléptica que apresenta alta taxa de morbimortalidade, além de elevado custo social e familiar”¹⁷.

Como os modelos clássicos para a esquizofrenia parecem ter chegado ao seu limite do ponto de vista terapêutico, o estudo de novos modelos também deve contribuir para a compreensão da doença e para o desenvolvimento de tratamentos mais eficientes. É provável que os conhecimentos das alterações genéticas relacionadas à esquizofrenia possam nortear tratamentos mais eficazes em relação aos sintomas e ao curso da doença.

1.2 Hipótese Purinérgica

Vários modelos têm sido propostos para explicar as bases neurobiológicas da esquizofrenia. Estes modelos relacionam-se com os sistemas dopaminérgico, glutamatérgico, serotoninérgico, colinérgico ou GABAérgico ¹⁸.

O sistema purinérgico usualmente relaciona-se aos nucleotídeos da adenina ATP, ADP e AMP e ao nucleosídeo adenosina, o qual possui vários papéis a parte do metabolismo energético. Os nucleotídeos da guanina e o nucleosídeo guanosina também são considerados parte deste sistema ¹⁸.

O papel do ATP como um neurotransmissor excitatório, central e periférico, é atualmente bem documentado ¹⁹. ATP é armazenado no botão pré-sináptico e liberado para exercer sua ação nos chamados receptores P2, os quais são classificados como ionotrópicos (P2X) e metabotrópicos (P2Y). Os receptores ionotrópicos mediam o fluxo de Ca^{2+} , Na^{+} e K^{+} , enquanto que os receptores metabotrópicos, via proteínas G, ativam segundo mensageiros. Após o ATP ser liberado das vesículas na fenda sináptica, ecto-nucleotidases tais como as ecto-NTPDases e as ecto-5'-nucleotidases promovem a hidrólise do nucleotídeo até adenosina (Fig. 1) ²⁰. A adenosina ativa o receptor chamado P1, os quais são classificados como A1, A2a, A2b e A3 ^{19 e 21}. Os receptores A1 são amplamente distribuídos no CNS e tem-se demonstrado que diminuem a excitabilidade neuronal e inibem a atividade sináptica e a liberação de vários neurotransmissores, tais como dopamina, glutamato, serotonina, noradrenalina e acetilcolina. Os

Em relação à dopamina, o modelo de esquizofrenia é baseado na ação correlacionada dos antagonistas dos receptores D2²³. Entretanto, os receptores de dopamina não parecem ser primariamente afetados na esquizofrenia. Neste contexto, Ferré e colegas²⁴ têm caracterizado interações diretas entre os receptores A2a/D2 e A1/D1 os quais levam a mudança na afinidade dos receptores dopaminérgicos na sua união com proteínas G. Por exemplo, o agonista A2a CGS 21680 reduz a afinidade do receptor D2 por agonistas de dopamina e inibe o aumento da atividade motora produzida pelos agonistas D2. Desta forma, é razoável sugerir que a alteração do metabolismo purinérgico, resultando numa concentração reduzida de adenosina extracelular, pode levar a um estado hiperdopaminérgico, ambos pelo aumento da sensibilidade do receptor e possivelmente pela redução da inibição mediada pelo receptor A1²⁵. De fato, o aumento da liberação de dopamina foi demonstrado na esquizofrenia^{26 e 27}.

O glutamato, principal neurotransmissor excitatório no SNC, age nos receptores ionotrópicos (NMDA, AMPA e kainato) e metabotrópico (mGlu)^{28 e 29}. Além dos bem documentados papéis em vários processos fisiológicos, tais como aprendizagem e memória, a hiperativação do sistema glutamatérgico leva a excitotoxicidade²⁸. Em relação à esquizofrenia, antagonistas dos receptores NMDA (fenciclidina, ketamina e MK-801) são hábeis para reproduzir sintomas positivos, negativos e cognitivos^{28 e 29}. Além disso, antagonistas de NMDA também estimulam a liberação de glutamato, o qual levaria a superestimulação de outros subtipos de receptores de glutamato³⁰. A adenosina tem sido bem caracterizada como um modulador endógeno

da atividade glutamatérgica. Adenosina inibe a liberação de glutamato e também a ação pós-sináptica dos neurotransmissores excitatórios a partir da hiperpolarização neuronal via receptores A1⁵⁴. Também, a ativação de receptores A1 pode inibir a função dos receptores MNDA independentemente de sua habilidade de hiperpolarizar neurônios^{31 e 61}.

Comportamentalmente, estudos pré-clínicos mostram que análogos da adenosina são anticonvulsivantes, ansiolíticos, sedativos¹⁹, antiagressivos³⁶, além de antipsicóticos²⁴.

Sendo assim, recentemente foi proposto um modelo purinérgico onde a atividade adenosinérgica estaria deficiente na esquizofrenia e haveria uma possível relação entre a esquizofrenia e o papel da adenosina^{18, 37 e 38}.

1.2.1 O Alopurinol e a Esquizofrenia

Alopurinol é uma droga conhecida, inibidora da enzima xantina oxidase, usada rotineiramente no tratamento de hiperuricemia e gota. Entretanto, estudos prévios e observações clínicas têm sugerido seu potencial de uso no tratamento de epilepsia refratária³⁹, mania⁴⁰ e comportamento agressivo em pacientes com desordens neurológicas⁴¹ e demência⁴². Estudos recentes têm demonstrado que o alopurinol pode ter um importante papel como adjuvante no tratamento da esquizofrenia. Brunstein e colegas (2005)⁴³ demonstraram em seu estudo, com pacientes moderadamente refratários, que o alopurinol foi

bem tolerado e produziu melhora significativa (mais de 20%) na Escala da Síndrome Positiva e Negativa (PANSS), particularmente para sintomas positivos quando administrado como adjuvante. Concordantemente, Akhondzadeh e colegas (2005)⁴⁴ demonstraram que a combinação de alopurinol com o antipsicótico haloperidol, mostrou significativa superioridade quando comparado com o tratamento somente com haloperidol para os sintomas positivos, sintomas psicopatológicos gerais bem como para a Escala da Síndrome Positiva e Negativa (PANSS) total.

O primeiro relato de tratamento de sintomas psiquiátricos com alopurinol foi em pacientes neurológicos com comportamento agressivo refratário⁴¹. A razão foi que a síndrome de Lesch-Nyhan, que é uma doença neurológica inata da recuperação do déficit de purinas, leva a um aumento da degradação de purinas, sendo associado com um severo comportamento agressivo e retardo mental. Já que o alopurinol inibe a enzima xantina oxidase, que é o último passo na degradação da purina para ácido úrico, a recuperação de purina seria aumentada e produziria um efeito anti-agressivo. No caso da esquizofrenia, um déficit na atividade da adenosina foi proposta como contribuinte da patofisiologia da esquizofrenia^{18 e 45}, e o aumento da atividade da adenosina tem sido sugerido como um alvo para intervenção terapêutica²⁴. A adenosina é um neuromodulador do sistema purinérgico com ações principalmente inibitórias no sistema nervoso central¹⁹ através de receptores A1 amplamente espalhados e receptores mesolímbicos estriatal A2A, os quais são co-localizados com

receptores D2²⁴. Agonista dos receptores A1 e A2A têm um claro perfil antipsicótico em modelos dopaminérgicos e glutamatérgicos^{24,46 e 47}.

Neste contexto, alopurinol é utilizado para aumentar a disponibilidade de purinas pela inibição da enzima xantina oxidase, a qual converte hipoxantina e xantina em ácido úrico. O acúmulo de hipoxantina e xantina podem favorecer a enzima hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase (HGPRT), que é responsável pela recuperação de purina⁴⁸, possibilitando um aumento nos níveis do neuromodulador adenosina^{39,41 e 49}(Fig. 2).

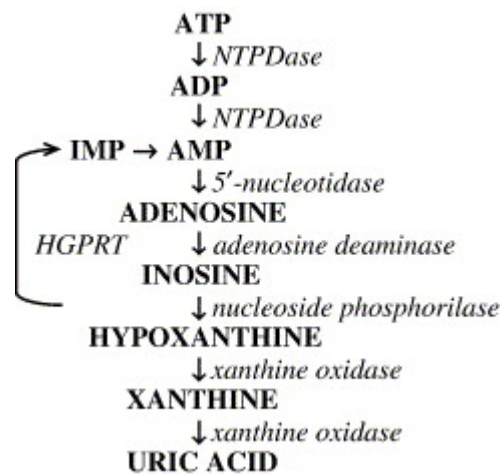


Fig. 2. Representação esquemática do metabolismo de purina do ATP ao ácido úrico (Fonte: DR Lara et al. 2006).

Os resultados destes estudos sugerem que alguns aspectos da esquizofrenia podem ser coerentes com um déficit na atividade adenosinérgica e alterações no sistema purinérgico, dando sustentação à hipótese purinérgica.

1.2.2 A Adenosina no Neurodesenvolvimento

De acordo com a hipótese do neurodesenvolvimento da esquizofrenia, uma alteração do desenvolvimento normal do cérebro particularmente na segunda metade da gestação para talvez o primeiro ano de vida pode levar a modificações traduzidas em alterações comportamentais e neuropsicológicas que se tornam mais evidentes na adolescência ⁴⁹. Vários mecanismos têm sido sugeridos como hipóxia e infecções virais ⁵¹. Estudos de neuroimagem têm mostrado, repetidamente, ventriculomegalia e redução do volume cerebral já no primeiro episódio psicótico ^{10,13 e 52}.

Todo dano levando a um aumento do turn-over do ATP como hipóxia, infecções e trauma eventualmente aumentam os níveis de adenosina extracelular ^{53 e 54}. Estudos prévios têm demonstrado que o aumento dos níveis de adenosina durante o início do desenvolvimento cerebral pode ter conseqüências importantes. Turner e colegas (2002) demonstraram que a administração de agonistas A1R no início do período pós-natal leva ao aumento ventricular e alterações na massa cinzenta e branca. A alteração histopatológica mais proeminente foi a diminuição do número e do volume dos axônios, o qual é acompanhado de uma redução de ~50% na densidade de A1R ⁵⁵. Esta foi a primeira evidência do efeito da neurotoxicidade da adenosina in vivo no cérebro imaturo, a qual contrasta com o seu papel neuroprotetor no cérebro maduro ³⁸. De grande importância, camundongos sem A1R foram totalmente protegidos contra o aumento no volume ventricular e

anormalidades na massa branca resultantes da hipóxia durante o início do período pós-natal ⁵⁶. Camundongos heterozigotos para A1R submetidos à hipóxia neonatal, apresentaram alterações intermediárias quando comparados a camundongos do tipo selvagem. Além disso, camundongos sem adenosina deaminase, uma enzima envolvida na degradação da adenosina, tiveram os níveis de adenosina aumentados oito vezes e o tamanho dos ventrículos duas vezes ⁵⁶. Estes resultados sugerem, fortemente, que em cérebros imaturos, a ação da adenosina sob os A1R é suficiente e necessária para neurotoxicidade induzida por hipóxia. O efeito tóxico pré ou peri-natal da adenosina poderia ser ativado por alguma situação levando a um desequilíbrio energético, quebra do ATP e conseqüente liberação de adenosina ³⁸.

Interessantemente, a neurotoxicidade da adenosina em cérebros imaturos afeta principalmente axônios, o que está de acordo com os achados na esquizofrenia sobre a aumentada densidade neuronal e reduzida arborização ⁵⁷.

Evidências recentes sugerem que, no mínimo em casos selecionados, há um aumento na perda cerebral em pacientes esquizofrênicos ^{52, 58 e 59}. Como a perda é de neuropilos inibitórios com a neurotoxicidade da adenosina no início do desenvolvimento cerebral, isto poderia resultar uma predominância relativa da atividade excitatória do glutamato. A reduzida atividade da adenosina, mediada por A1R, pode aumentar a vulnerabilidade cerebral ao dano na maturidade pela alteração entre o balanço protetor da adenosina e as ações excitotóxicas do glutamato ⁶⁰. Isto é sustentado pelo bem documentado papel da adenosina como um agente endógeno

neuroprotetor demonstrado pelas lesões causadas pelos antagonistas do A1R^{53 e 61} e a aumentada suscetibilidade de camundongos sem A1R à hipóxia em cérebro maduro. Também, camundongos sem A1R demonstraram desmielinização, injúria axonal e desfecho neurológico ruim em modelos animais de inflamação cerebral ⁶². Assim, o modelo da adenosina sugere um mecanismo bioquímico único que é compatível com o modelo proposto “two-hit” por Shenton et al., (2001): interrupção no início do desenvolvimento cerebral (primeiro “hit” – neurotoxicidade mediada pela adenosina levando a diminuição na densidade dos A1R) e “poda” sináptica aberrante ou aumentada neurodegeneração durante a última maturação cerebral (segundo “hit” – reflexo da neuromodulação deficiente em adenosina nas sinapses maduras) ⁵².

A transição do papel neurotóxico para neuroprotetor da adenosina e a ontogenia da função inibitória da adenosina ainda não foi bem caracterizada durante o período da infância para a maioridade. Contudo, crianças parecem ser menos suscetíveis aos efeitos estimuladores da cafeína do que adultos ⁶³. Em ratos, a cafeína estimula a atividade locomotora em adultos, mas não em jovens ⁶⁴. A mudança na resposta a xantinas pode estar relacionada ao aumento na densidade de ambos receptores A1 e A2a até quatro semanas de idade ^{65, 66 e 67}, que é equivalente ao início da puberdade em humanos. Já os efeitos da cafeína em baixas doses são atribuídos principalmente ao bloqueio dos receptores A2a e sua interação com os receptores D2 ⁶⁸. Esta interação pode contribuir para o aparecimento dos sintomas psicóticos no final da adolescência e início da maioridade. Ao todo, esses achados podem correlacionar o início dos sintomas da

esquizofrenia no final da adolescência e início da maioridade quando a ação inibitória da adenosina se torna mais importante ³⁸.

1.2.3 Adenosina Deaminase (ADA)

A enzima adenosina deaminase (ADA) tem sido objeto de considerável interesse devido ao seu papel na manutenção dos níveis de adenosina, intra e extracelular, catalisando sua deaminação à inosina. Além de sua localização intracelular clássica, a ADA também está presente como uma ecto-enzima (Ecto-ADA) na superfície de muitos tipos celulares incluindo linfócitos e neurônios ⁶⁹. Na superfície neuronal a ADA está ligada aos receptores de adenosina A1 (A1R), que podem ser importantes na regulação local da neurotransmissão de adenosina no SNC ⁷⁰.

O gene da ADA foi identificado no braço longo do cromossomo 20 ⁷¹. Por meio de estudos de dosagem e pelo estudo de um paciente com deleção intersticial 20q, o gene da ADA foi encontrado mais precisamente na região da banda 20q13.11 ^{72 e 73}. O produto do gene ADA1 consiste de 363 aminoácidos e há um alto grau de conservação na seqüência de aminoácidos entre as espécies ^{74 e 75}. O produto de 41 kDa do gene ADA1 pode ser facilmente estudado em eritrócitos. Hirschhorn et al. (1994) encontraram que uma substituição Asp8Asn é responsável por um polimorfismo genético. De fato, a substituição de um Asn neutro por um Asp aniônico é consistente com a menor migração eletroforética anodal das bandas de proteína correspondentes ao fenótipo da chamada ADA2 ⁷⁶. Entretanto, atualmente este

polimorfismo é frequentemente referido como ADA1*2, ou seja, essa é uma aloenzima polimórfica da ADA1 ⁷⁷. Em publicação recente Zavialov e Engström (2005) caracterizaram ADA2 como uma isoenzima da ADA1 pertencente a uma nova família de fatores de crescimento com atividade adenosina deaminase (ADGF – ADA-related growth factors) ⁷⁸.

Mais de 30 variantes alélicas da ADA são atualmente listadas no banco de dados Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) (accession nº 608958). Entretanto, muitas destas variantes representam alelos não funcionais. O alelo mais freqüente, que é assintomático em portadores heterozigotos, é resultante da transição de G para A no nucleotídeo 22 do exon 1 (22G→A) ⁷⁹. As seguintes freqüências genótípicas ocorrem em uma população caucasiana saudável: G/G, 88-92%; G/A, 8-12%; e A/A, < 1% ⁸⁰ e ⁸¹. Foi demonstrado que indivíduos com o genótipo G/A exibem uma atividade enzimática 20 – 30% menor, em eritrócitos e leucócitos, do que indivíduos com o genótipo G/G ⁸². Foi sugerido que a baixa atividade da ADA neste polimorfismo, e o conseqüente aumento nos níveis de adenosina extracelular, possa estar associada a doenças como imunodeficiência combinada (ADA-SCID)⁸³, asma atópica⁷⁸, aborto espontâneo recorrente⁸⁴, autismo⁸¹, depressão⁸⁵ e retardo mental leve⁷⁷.

1.3 Outros genes estudados na esquizofrenia

A pesquisa de lócus cromossômicos e genes associados com a esquizofrenia é bastante complexa, já que se trata de uma doença poligênica ou oligogênica em que a influência de um único gene na susceptibilidade da doença é relativamente pequena ⁸⁶. Atualmente, análises de ligação envolvendo a pesquisa de regiões cromossômicas específicas implicadas na suscetibilidade à esquizofrenia têm sido confusas pela dificuldade de reprodução dos resultados assim como a obtenção freqüente de resultados contraditórios. Porém, algumas descobertas têm revelado grande consistência a respeito de suposta suscetibilidade de determinados lócus. Em uma classificação baseada numa varredura genômica, Lewis e colegas (2003)⁸⁷ concluíram que os dados favoreciam a ligação da região 2q e também sustentavam a evidência de suscetibilidade dos lócus nas seguintes regiões: 5q, 3p, 11q, 6p, 1q, 8p, 22q, 20q e 14p. Essas descobertas levaram ao mapeamento de várias regiões ligadas e a identificação de genes específicos os quais conferem risco ao desenvolvimento de esquizofrenia. Vários desses genes são estudados atualmente como: *neuroregulina 1 (NRG1 - 8p21-22p)*, *regulador da sinalização da proteína-G 4 (RGS4 - 1q21-22q)*, *dysbindin (DTNBP1 - 6p22.3)*, *catecol-o-metiltransferase (COMT - 22q11)*, *prolina dehidrogenase (PODH - 22q11)* e *disrupted-in-schizophrenia 1 (DISC1 - 1q42)* ⁸⁶.

1.4 OBJETIVOS

A partir de amostras de DNA, foi investigada a possível associação entre o polimorfismo G22A na sequência de DNA no gene que codifica a enzima adenosina deaminase e a esquizofrenia.

2 ARTIGO CIENTÍFICO

Artigo científico submetido à revista Schizophrenia Research.

Lower Frequency of the adenosine deaminase polymorphism (ADA1 *2) in Schizophrenic Patients.

Dutra G^a, Ottoni G^b, Lara DR^a, Bogo MR^{a,*}

^a *Faculdade de Biociências da PUCRS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.*

^b *Departamento de Bioquímica da UFRGS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.*

Abstract

The purinergic system, especially adenosine, can play a role in the pathophysiology of schizophrenia. Activation of adenosine A1R inhibits the release of several neurotransmitters, such as glutamate, dopamine, serotonin and acetylcholine, and decreases neuronal activity by post-synaptic hyperpolarization. Adenosine deaminase (ADA) participates in purine metabolism by converting adenosine into inosine. The most frequent functional polymorphism of ADA (22 G→A) (ADA1 *2) exhibits 20-30% lower enzymatic activity in individuals with the G/A genotype than individuals with the G/G genotype. We evaluated this polymorphism in 152 schizophrenic patients and 111 healthy controls. We observed a significant decrease in frequency of the low-activity ADA1 *2 allele in schizophrenic patients (7 – 4.6%) relative to controls (13 – 11.7%, $p= 0.032$, OR=2.6). These results suggest that ADA1 *2 allele associated with low ADA activity, and putatively with higher adenosine levels, is less frequent among schizophrenic patients.

Key words: polymorphism, adenosine, adenosine deaminase, schizophrenia.

**Corresponding author:* Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul . Av. Ipiranga 6610, Partenon, CEP. 90.610-000, Porto Alegre, RS, Brazil
E-mail address: mbogo@pucrs.br

1 Introduction

Schizophrenia is a severe psychiatric illness and its pathophysiology remains puzzling. Many neurochemical hypotheses have been suggested related to dopaminergic, serotonergic, GABAergic, cholinergic and glutamatergic neurotransmission systems. We have proposed that the purinergic system, specifically a deficit in adenosinergic activity, can play a role in schizophrenia, especially because this system modulates most neurotransmitter systems (Lara and Souza, 2000, Lara et al, 2006)

The purinergic system comprises two main effectors, namely the neuromodulator adenosine acting on A1, A2a, A2b and A3 receptors (Fredholm et al. 2005), and the nucleotide ATP, acting on purinergic P2X and P2Y receptors (Ralevick and Burnstock, 1998). After ATP is released in the synaptic cleft from vesicles, ecto-nucleotidases promote nucleotide hydrolysis down to adenosine (Zimmermann, 1996). Activation of adenosine A1R inhibits the release of several neurotransmitters, such as glutamate, dopamine, serotonin and acetylcholine, and decreases neuronal activity by post-synaptic hyperpolarization (Dunwiddie and Masino, 2001). These neuromodulatory actions under physiological conditions can be separated from homeostatic roles under stressful or pathophysiological conditions (Cunha, 2001), when adenosine formed from intracellular ATP breakdown is released and attenuates excitotoxicity by glutamate. Due to the above mentioned, adenosine is considered an endogenous anticonvulsant and neuroprotective agent. Accordingly, pre-clinical studies show that administration of A1R agonists exerts anticonvulsant, neuroprotective, anxiolytic, sedative (Dunwiddie and Masino, 2001; Ralevic and Burnstock, 1998), anti-aggressive (Ushijima et al., 1984), as well as antipsychotic-like actions (Ferre, 1997; Kafka and Cobertt, 1996; Sills et al., 1999). On the other hand, Turner et al. (2002b) have shown that administration of an A1R agonist in the early postnatal periods leads to ventricular enlargement and diffuse gray and white matter alterations. The most prominent histopathological alteration was decreased axonal number and volume, which is accompanied by ~50% reduction in A1R. This was the first evidence for an in vivo neurotoxic effect

of adenosine in the immature brain, which contrasts with its neuroprotective role in the mature brain.

A2aR and D2R are co-localized in GABAergic striatopallidal neurons and form functional heteromeric complexes, with opposing actions via coupling with G proteins (Ferre, 1997; Hillion et al., 2002). Activation of A2aR decreases the affinity for D2 receptor antagonists (Ferre, 1997) and A2aR knockout mice present increased aggressiveness, anxiety and hypoalgesia (Ledent et al., 1997) and reduced behavioral effects with amphetamine and cocaine administration (Chen et al., 2000).

Adenosine Deaminase (ADA) participates in purine metabolism by converting either adenosine or 2'-deoxyadenosine into inosine or 2'-deoxyinosine, respectively. Further metabolization of these deaminated nucleosides leads to hypoxanthine, which can be either transformed into uric acid by xanthine oxidase or salvaged into mononucleotides by hypoxanthine-guanine phosphoribosyl-transferase (Mills et al., 1976). Beside its classical intracellular localization, ADA is an ectoenzyme (Ecto-ADA) on the surface of many cell types, including lymphocytes and neurons (Franco et al., 1996) where it behaves as a cell adhesion molecule with an important role in the regulation of neuronal growth and plasticity processes. The most frequent functional polymorphism of ADA is caused by a G-to-A transition at nucleotide 22 (coding DNA 22G→A). This transition leads to the substitution of asparagine for aspartic acid at codon 8 (protein Asp8Asn) of the ADA protein (Hirschhorn et al., 1994). Individuals with the G/A genotype exhibit 20-30% lower enzymatic activity in erythrocytes and leucocytes than individuals with the G/G genotype (Battistuzzi et al., 1981). This polymorphism has been associated to autism (Bottini et al., 2001) and mild mental retardation (Saccucci et al., 2006). In both studies, a high frequency of the low-activity genotype ADA-Asn 8 (ADA-8Asn) (ADA1 *2) of adenosine deaminase was found. This genotype was also associated with the duration and intensity of deep sleep in healthy subjects (Ret y et al., 2005), reinforcing the functional consequences of this polymorphism on adenosine-mediated neuromodulation. The following genotype frequencies are expected to occur in a healthy Caucasian population: G/G, 88-92%; G/A, 8-12%; A/A, <1% (Persico et al., 2000; Ret y et al., 2005).

In this paper, we evaluated the ADA polymorphism 22 G→A (ADA1*2) in schizophrenic patients and healthy controls.

2 Subjects and Methods

The study protocol and all experimental procedures were approved by the national ethic committee in research on human subjects. All subjects received a full explanation and written description of the procedures. The investigators concluded that all subjects understood the procedures, and written informed consent was obtained. We determined diagnoses by using best-estimate procedures incorporating the Structured Clinical Interview for DSM-IV Axis I Disorders (SCID-I).

Genomic DNA was extracted from 300 μ L blood samples using the “Perfect gDNA Blood Mini” (Ependorf) or “Wizard[®] Genomic Purification Kit” (Promega). The genotypes of the ADA 22G→A were analyzed in 100 ng of DNA with allele-specific PCR. HotStarTaq DNA polymerase (Qiagen) and allele-specific primers were used. ADA primers were as follows: forward-G, 5’ –CCC AGA CGC CCG CCT TCG-3’; forward-A, 5’ –CCC AGA CGC CCG CCT TCA- 3’; reverse, 5’ –GAA CTC GCC TGC AGG AGC C- 3’ (annealing temperature, 62 °C; 1,5 nM MgCl₂; 1 x Q-solution) (adapted of Rétey et al. 2005). The amplification product of 152 pb was visualized with Gel Red in U.V. illumination. Genotype frequency was compared between cases and controls, and the statistical significance of the associations was tested using the chi-square test. Odds ratio with 95% confidence intervals were also calculated to estimate the strength of the association between adenosine deaminase genotype and schizophrenia and its statistical significance.

3 Results

The schizophrenic group consisted of 152 patients (108 males) with mean age of 36.7 ± 10.8 years old. The control group of healthy individuals consisted of 111 members (40 males) with mean age of 44.4 ± 15.5 years old.

Table 1 shows the distribution of ADA genotypes in schizophrenic patients and healthy individuals. In the group of healthy individuals there was

a higher frequency of the ADA1 *2 polymorphism than in the schizophrenic group (P=0.032, odds ratio 2.7; IC 95% 1.1-7.1).

4 Discussion

The frequency of ADA1 *2 allele in the control group was similar to the values reported by others researchers (Spencer et al., 1968; Persico et al., 2000, Rétey et al., 2005). Our results showed that ADA1 *2 variant was less frequent in schizophrenic patients (GG 95.4% and GA 4.6%) than in the general population (GG 88.3% and GA 11.7%). To our knowledge there is no report on the association between ADA polymorphism and schizophrenia. However, serum adenosine deaminase activity was found increased in schizophrenic patients under pharmacological treatment (Brunstein et al, 2007), but it remains to be established if this increase is related to the phenotype or due to medication.

Several indirect findings are suggestive of adenosine dysfunction in schizophrenia (Lara et al. 2006). The psychostimulants caffeine and theophylline are the closest pharmacological models for adenosine hypofunction in humans since they are non-selective antagonists of A1R and A2aR and their biological effects are attributed to the mechanism of action (Fredholm et al., 1999). In contrast to the intermittent and relatively weak blockade of adenosine receptors produced by low-dose caffeine intake normally observed in humans, schizophrenia patients would have a persistently decreased adenosinergic and, consequently, increased dopaminergic and glutamatergic activity. Theophylline and caffeine are able to decrease P50 sensory gating in normal volunteers, mimicking the findings in schizophrenic patients (Ghisolfi et al, 2002, 2006) and caffeine exacerbates symptoms of schizophrenia (Ferré, 1997). Moreover, psychostimulant effects of caffeine are blocked by D2 receptor antagonists (Ferré, 1997; Powell et al., 2001). Regarding the glutamatergic system, NMDA receptor antagonists (phencyclidine, ketamine and MK-801) are able to produce the positive, negative and cognitive symptoms of schizophrenia (Olney and Farber, 1995; Krystal et al., 2002) possibly related to increased glutamate release. In

animals models of schizophrenia, A1 and A2aR agonists have been repeatedly shown to prevent behavioral as well as neurophysiological (EEG and prepulse inhibition) alterations induced by NMDA antagonists (Browne and Welch, 1982; Kafka and Corbett, 1996; Popoli et al., 1997; Rimondini et al., 1997; Sills et al., 1999), indicating a potential antipsychotic effect in humans.

The polymorphism of ADA protein that changes its electrophoretic mobility has been known since 1968, and its molecular basis (G22A, Asp8Asn) since 1994 (Hirschhorn, 1994). It has been hypothesized that the differences in enzymatic activity between ADA genotypes could result in differences in immune reactivity (Bottini et al., 1981). Stubbs et al. (1982) reported decreased ADA serum activity in 18 children with autism compared to a group of 19 normal controls, 16 individuals with cerebral palsy and 17 individuals with intellectual impairment (*F-test* 0.02 when compared with other group). A significantly increased frequency of *2 allele was observed in a study with 118 Italian autistic children compared with 126 healthy controls (by genotype Asp/Asn $P < 0.0001$; by allele Asn frequency $P < 0.00001$) (Bottini et al., 2001). However, Zoruglu et al. (2004) measured activities of erythrocyte free radical scavenging enzymes, including ADA, in 27 children with autism and 26 sex- and age-matched controls and found no differences in ADA activity between the two groups ($P = 0.52$). In contrast to the previous genetic studies, a recent study found no significant increase in the frequency of the ADA *2 allele in cases from North America (controls: 7.2%; cases: 4.8%) (Hettinger et al., 2007). Thus, the role of ADA in autism remains controversial. The low-activity ADA-8Asn polymorphism has been associated with mild mental retardation showing genotype frequency with $P < 0.05$ and odds ratio 2.16 (Saccucci et al., 2006). These are relevant since cognitive problems and autistic symptoms are part of schizophrenia syndrome. Previous studies indicate a direct role of adenosine in human sleep homeostasis (Basheer et al, 2004), with ADA*2 variant was associated with better sleep. Individuals with the G/A genotype ($n = 13$) reported fewer awakenings at night than individuals with the G/G genotype ($n = 106$). Moreover, individuals with G/A genotype showed almost twice the amount of deep, stage-4 sleep and roughly 30 min more slow-wave sleep within the 8-h sleep period when compared with the G/G genotype. This suggests that the ADA

22G→A polymorphism modulates not only the duration of slow-wave sleep but also the intensity of sleep (Rétey et al., 2005). Unmedicated schizophrenic patients had longer sleep onset latency, slept less and had lower sleep efficiency (Nishino et al., 1998; Keshavan et al., 1998). These results are in accordance with a proposal of reduced adenosine activity in schizophrenia. The lower frequency of the ADA1 *2 allele in schizophrenics suggests that this allele may be protective against a hypoadenosinergic state.

In conclusion, our data suggest, for the first time, that the ADA1 *2 allele associated with low ADA activity, and putatively with higher adenosine levels, is less frequent among schizophrenic patients. This finding is in line with the hypothesis of lower adenosinergic activity in schizophrenia, but replication with independent and larger samples is needed.

Acknowledgement

This study was supported with grants from CNPq (National Counsel of Technological and Scientific Development).

REFERENCES

- Basheer R, Strecker RE, Thakkar MM, McCarley RW. Adenosine and sleep-wake regulation. *Prog Neurobiol.* 2004; 73(6):379-96.
- Battistuzzi G., Ludicone P., Santolamazza P., Petrucci R.. Activity of adenosine deaminase allelic forms in intact erythrocytes and lymphocytes. *Ann Hum Genet* 1981, 45: 15-19.
- Bottini E., Carapella E., Cataldi L., Nicotra M., Lucarelli P., Lucarini N., Pascone R., Gloria-Bottini F.. Adenosine deaminase polymorphism. Associations at clinical level suggest a role in cell functions and immune reactions. *J Med Genet* 1981; 18: 331-334.
- Bottini N, De Luca D, Saccucci P, Fiumara A, Elia M, Porfirio MC, Lucarelli P, Curatolo P.. Autism: evidence of association with adenosine deaminase genetic polymorphism. *Neurogenetics* 2001; 3: 111–113.
- Browne R.G., Welch W.M.. Stereoselective antagonism of phencyclidine's discriminative properties by adenosine receptor agonists. *Science* 1982; 4565: 1157-9.
- Brunstein M.G., Silveira E.M. Jr., Chaves L.S., Machado H., Schenkel O., Belmonte-de-Abreu P., Souza D.O., Lara D.R.. Increased serum adenosine deaminase activity in schizophrenic receiving antipsychotic treatment. *Neuroscience Letters* 2007; 414(1): 61-4.
- Cunha R.A.. Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in

- the nervous system: different roles, different sources and different receptors. *Neurochem Int* 2001; 2: 107-125.
- Dunwiddie T.V., Mansino S.A.. The role and regulation of adenosine in central nervous system. *Annu Rev Neurosci* 2001; 31-55.
- Ferré S.. Adenosine-dopamine interactions in ventral striatum. Implications for the treatment of schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl)* 1997; 2: 107-20.
- Franco R., Casadó V., Ciruela F., Saura C., Mallol J., Canela E., Lluís C.. Cell surface adenosine deaminase: much more than an ectoenzyme. *Prog Neurobiol* 1997; 52: 283-94.
- Fredholm B.B., Battig K., Holmen J., Nehlig A., Zvartau E.E.. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacol Rev* 1999; 1: 83-133.
- Fredholm B.B., Chen J.F., Cunha R.A., Svenningsson P., Vaugeois J.M.. Adenosine and brain function. *Int Rev Neurobiol* 2005; 63: 191-279.
- Ghisolfi E.S., Prokopiuk A.S., Becker J., Ehlers J.A., Belmont-de-Abreu P., Souza D.O. et al.. The adenosine antagonist theophylline impairs p50 auditory sensory gating in normal subjects. *Neuropsychopharmacology* 2002; 4: 629-37.
- Hettinger J.A., Liu X., Jeltje J., Holden A.. The G22A polymorphism of the ADA gene and susceptibility to autism spectrum disorders. *J Autism Dev Disord* 2007; (38) 1: 14-19.
- Hillion J., Canals M., Torvinen M., Casado V., Scott R., Terasma A., et al.. Coaggregation, cointernalization, and codesensitization of adenosine A2a receptors and dopamine D2 receptors. *J Biol Chem* 2002; 20: 18091-7.
- Hirschhorn R., Yang D.R., Israni A.. An Asp8Asn substitution results in the adenosine deaminase (ADA) genetic polymorphism (ADA2 Allozyme): occurrence on different chromosomal backgrounds and apparent intragenic crossover. *Ann Hum Genet* 1994; 58: 1-9.
- Kafka S.H., Cobertt R.. Selective adenosine A2a receptor/dopamine D2 receptor interactions in animal models of schizophrenia. *Fur J Pharmacol* 1996; 2-3: 147-54.
- Keshavan M.S., Reynolds C.F. III, Miewald J.M. et al.. Delta sleep deficits in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 1998; 55: 443-448.
- Krystal J.H., Anand A., Moghaddam B.. Effects of NMDA receptor antagonists: implications for the pathophysiology of schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 2002; 7: 663-4.
- Lara D.R., Souza D.O.. Schizophrenia: a purinergic hypothesis. *Medical hypothesis*, 54 (2), 157-166, 2000.
- Lara D.R., Dall'Igna O.P., Ghisolfi E.S., Brunstein M.G.. Involvement of adenosine in the neurobiology of schizophrenia and its therapeutic implications. *Prog Neuro-Psych Biol Psych* 2006, 30: 617-29.
- Ledent C., Vaugeois J.M., Schiffmann S.N., Pedrazzini T., El Yacoubi M., Vanderhaeghen J.J., et al.. Aggressiveness, hypoalgesia and high blood pressure in mice lacking the adenosine A2a receptor. *Nature* 1997; 6643: 674-8.
- Mills G.C., Schmaltieg F.C., Trimmer K.B., Goldman A.S., Goldblum R.M.. Purine metabolism in adenosine deaminase deficiency. *Proc natn Acad Sci U.S.A.* 1976; 2867-2871.
- Nishino S., Mognot E., Benson K.L., Zarccone V.P.Jr.. Cerebrospinal fluid prostaglandins and corticotropin releasing factor in schizophrenics and

- controls: relationship to sleep architecture. *Psychiat Res* 1998; 78: 141-150.
- Olney J.W., Farber N.B.. Glutamate receptor dysfunction and schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 1995; 12: 998-1007.
- Persico A.M., Militerni R., Bravaccio C., Schneider C., Melmed R., Trillo S., Montecchi F., Palermo M.T., Pascucci T., Puglisi-Allegra S., et al.. Adenosine deaminase alleles and autistic disorder: case-control and family-based. *Am J med Genet* 2000; 96: 784-790.
- Popoli P., Reggio R., Pezzola A.. Adenosine A1 and A2 receptor agonists significantly prevent the electroencephalographic effects induced by MK-801 in rats. *Eur J Pharmacol* 1997; 2-3: 143-6.
- Powell K.R., Luvone P.M., Holtzman S.G.. The role of dopamine in the locomotor stimulant effects and tolerance to these effects of caffeine. *Pharmacol Biochem Behav* 2001; 1-2: 59-70.
- Ralevic V., Burnstock G.. Receptors for Purines and Pyrimidines. *Pharmacol Rev* 1998; 50: 413-492.
- Rétey J.V., Adam M., Honegger E., Khatami R., Luhmann U.F.O., Jung H.H., Berger W., Landolt H.P.. A functional genetic variation of adenosine deaminase affects the duration and intensity of deep sleep in humans. *PNAS* 2005; (102) 43: 15676-81.
- Rimondini R., Ferre S., Ogren S.O., Fuxe K.. Adenosine A2A agonists: a potential new type of atypical antipsychotic. *Neuropsychopharmacology* 1997; 2: 82-91.
- Saccucci P., Arpino C., Rizzo R., Gagliano A., Valzone A, Lalli C., Galasso C., Curatolo, P.. Association of Adenosine Deaminase Polymorphism with Mild Mental Retardation. *J Child Neurol*, 2006; 21 (9): 753-756
- Sills T.L., Azampanah A., Fletcher P.J.. The adenosine A1 receptor agonist N6-cyclopentyladenosine blocks the disruptive effect of phencyclidine on prepulse inhibition of the acoustic startle response in the rat. *Eur J Pharmacol* 1999; 3: 325-9.
- Stubbs G., Litt M., Lis E., Jackson R., Voth W., Lindberg A., Litt R.. Adenosine Deaminase Activity Decreased in Autism. *Jour Am Acad Child Psychi* 1982; (21) 1: 71-74.
- Turner C.P., Yan H., Schwartz M., Othman T., Rivkees S.A.. A1 adenosine receptor activation induces ventriculomegaly and white matter loss. *NeuroReport* 2002b; 9: 1199-204.
- Ushijima I., Katsuragi T., Furukawa T.. Involvement of adenosine receptor activities in aggressive responses produced by clonidine in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 1984; 4: 335-9.
- Wardas J.. Neuroprotective role of adenosine in the CNS. *Pol J Pharmacol* 2002; 54: 313-326.
- Zimmermann H.. Biochemistry, localization and functional roles of ecto-nucleotidases in the nervous system. *Prog Neurobiol* 1996; 6: 589-618.
- Zoroglu S.S., Armutcu F., Ozen S., Gurel A., Silvasli E., Yetkin O., et al.. Increased oxidative stress and altered activities of erythrocyte free radical scavenging enzymes in autism. *Eur Arch Psych Cli Neur* 2004; 254: 143-147.

Table 1. ADA G22A (ADA1 *2) Genotype distributions in healthy controls and individuals with schizophrenia.

Genotype	Healthy Controls	Schizophrenic Patients
GG	98 (88.3%)	145 (95.4%)
GA	13 (11.7%) *	7 (4.6%)
AA	0	0
Total	111	152

* P = 0.032

Odds Ratio: 2.7 (95% confidence interval: 1.1-7.1)

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como a esquizofrenia apresenta uma base genética importante, é necessário investigar a influência de polimorfismos em genes que possam estar relacionados com o risco para desenvolver este transtorno.

Alterações no sistema purinérgico, principalmente nos níveis de adenosina, podem levar a um desequilíbrio de outros sistemas modulados por ele (dopaminérgico, glutamatérgico, etc) bem como à toxicidade mediada por adenosina. Estudos prévios sugerem que o aumento dos níveis de adenosina, no início do desenvolvimento cerebral, pode ser neurotóxico resultando em uma diminuição na densidade de receptores A1 afetando o desenvolvimento e a plasticidade neuronal. Além disso, estudos têm demonstrado que agonistas dos receptores A1 produzem ventriculomegalia, uma característica comum encontrada em pacientes esquizofrênicos em estudos de neuroimagem. Por outro lado, no cérebro maduro, níveis elevados de adenosina desempenham uma função neuroprotetora através de uma atividade neuromoduladora inibitória de outros

neurotransmissores. Sendo assim, fica implícita a importância do bom funcionamento do sistema purinérgico tanto na fase de desenvolvimento neural como no cérebro maduro onde os níveis de adenosina terão papéis ambíguos.

A enzima adenosina deaminase é uma das responsáveis pela manutenção dos níveis de adenosina extracelular. Portanto, um polimorfismo funcional onde há a substituição da Asparagina pelo Ácido Aspártico na posição 8 da proteína que leva a uma diminuição da atividade catalítica em torno de 20-30%, provavelmente interfere nos níveis de adenosina extracelular. De fato, esse polimorfismo já foi associado a vários distúrbios como o autismo (aumenta o risco), retardo mental leve (aumenta o risco) e qualidade do sono (melhora o sono) entre outros.

No caso da esquizofrenia este polimorfismo parece estar associado de forma diferente, ou seja, a baixa frequência desse alelo entre os pacientes contribui para o estabelecimento de um quadro de hipofunção adenosinérgica. Sendo assim, a baixa frequência do alelo ADA-Asn8 entre os esquizofrênicos sugere que este alelo possa ser protetor contra um estado hipoadenosinérgico.

Para concluir, os dados sugerem, pela primeira vez, que o alelo polimórfico ADA1 *2 associado com a baixa atividade, e consequentemente a altos níveis de adenosina, é menos frequente entre os pacientes esquizofrênicos. Estes dados corroboram com a hipótese de baixa atividade adenosinérgica na esquizofrenia, mas a replicação independente e o aumento do número de amostras é necessário.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CATALDO, Neto A.; GAUER, G.J.C.; FURTADO, N.R. **Psiquiatria para estudantes de medicina**. Porto Alegre: EDPUCRS, 2003. 944p
2. CAMPBELL, R. **Dicionário de psiquiatria**. São Paulo: Martins Fontes, 1986.
3. DALGALARRONDO, P. **História e Psicopatologia do transtorno Boderline: da esquizofrenia latente aos transtornos de Personalidade**. In *Psiquiatria Biológica*, v. IV, n 3, set-1996.
4. HOLMES, David S. **Psicologia dos transtornos mentais**. Porto Alegre: Artes Médicas, 2001. 2ed. 565p.
5. SAHA, Sukanta; CHANT, David; WELHAM, Joy; McGRATH, John. A Systematic Review of the Prevalence of Schizophrenia. *Plos Med*, 2005; 2(5): e141.
6. CARPENTER, W.T.; BUCHANAN R.W. **Esquizofrenia: introdução e panorama geral**. In: KAPLAN, H.I.; SADOCK, B.J. *Tratado de Psiquiatria*. Trad. Andréa Callefi, et al. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 1999. p. 959-972.
7. MURRAY, C.J.L.; LOPEZ, A.D. **The global burden of disease**. *Harvard School of Public Health*, 1996.
8. McGRATH, John. Variations in the Incidence of Schizophrenia: Data Versus Dogma. *Schizophrenia Bulletin*, 2006; 32(1): 195-197.

- 9 ALBUS, M.; SCHERER, J.; HUEBER, S.; LECHLEUTHNER, T.; KRAUS, G.; ZAUSINGER, S., et al. The impact of Familial loading on gender differences in age at onset of schizophrenia. ***Acta Psychiatr Scand***, 1994; 89:132-134.
10. LARA, D.R., ABREU, P.B.. Esquizofrenia: In: Kapczinski F., Quevedo J., Izquierdo I (eds). **Bases Biológicas dos Transtornos Psiquiátricos**. Porto Alegre: Artmed, 2000; pp. 109-117.
11. WEIMBERGER, D.R.. Schizophrenia as a neurodevelopmental disorder. In Hirsch S.R. and Weimberger D.R. (eds). **Schizophrenia**. Oxford: Blackwell Science, 1995, 293-323.
12. LIPSKA, B.K., JASKIW G.E., WEIMBERGER D.R.. Postpubertal emergence of hyperresponsiveness to estress and amphetamine after neonatal excitotoxic hippocampal damage: A potential animal model of schizophrenia. **Neuropsychopharmacology** 1993; 9: 67-75.
13. ELKIS H., FRIEDMAN L., WISE A., MELTZER H.Y.. Meta-analyses of studies of ventricular enlargement of cortical sulcal prominence in mood disorder – Comparison to controls or patients with schizophrenia. **Arch Gen Psychiatry** 1995; 52: 735-746.
14. MURPHY K.C., GARDON A.G., MCGUFFIN P.. The molecular genetics of schizophrenia. **J Mol Neurosci** 1996; 147-157.
15. Basic Neurochemistry.
16. HALL, Wayne. Is Cannabis use Psychotogenic? **Lancet**, 2006; 367(9506): 193-05.
17. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência à Saúde. Departamento de Sistemas e Redes Assistenciais. Protocolos Clínicos e Diretrizes Terapêuticas: Medicamentos Excepcionais. Brasília: **Ministério da Saúde**: 2002.
18. LARA, D.R.; SOUZA, D.O. Schizophrenia: a purinergic hypothesis. **Medical Hypothesis**, 2000; 54(2):157-166.
19. RALEVIC, V.; BURNSTOCK, G. Receptors for Purines and Pyrimidines. **Pharmacol Rev**, 1998; 50:419-492.

20. ZIMMERMANN H.. Biochemistry, localization and functional roles of ecto-nucleotidases in the nervous system. *Prog Neurobiol* 1996; 6: 589-618.
21. BRUNDEGE, J.M.; DUNWIDE, T.V. Role of adenosine as a modulator of synaptic activity in the central nervous system. *Adv Pharmacol*, 1997; 39:353-391.
22. NEHLIG, A.; DAVAL, J.L; DEBRU, G. Caffeine and the central nervous system: mechanisms of action, biochemical, metabolic and psychostimulant effects. *Brain Res Rev*, 1992; 17:139-170.
23. SEEMAN, P.; TALLERICO, T. Antipsychotic drugs which elicit little or no Parkinsonism bind more loosely than dopamine to brain D2 receptors, yet occupy high levels of these receptors. *Mol Psychiatry*, 1998; 3:123-134.
24. FERRÉ, S. Adenosine-dopamine interactions in the ventral striatum: implications for treatment of schizophrenia. *Psychopharmacology*, 1997; 133:107-120.
25. ZETTERSTRÖM, T.; FILLENZ, M. Adenosine agonists can both inhibit and enhance in vivo striatal dopamine release. *Eur J Pharmacol*, 1990; 180:137-143.
26. HIETALA, J.; SYVALAHTI, E.; VUORIO, K., et al. Presynaptic dopamine function in striatum of neuroleptic-naive schizophrenic patients. *Lancet*, 1995; 346:1130-1131.
27. LINDSTRÖM, L.H.; GEFVERT, O.; HAGBERG, G., et al. Increased synthesis of dopamine in prefrontal cortex and striatum in drug-naïve schizophrenic patients studied by use of C11-labelled I-DOPA and PET. *Schizophr Res*, 1998; 29:93-94.
28. OLNEY, J.W.; FARBER, N.B. Glutamate receptor dysfunction and schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry*, 1995; 12:998-1007.
29. KRYSTAL, J.H.; AMAND, A.; MOGHADDAM, B. Effects of NMDA receptor antagonists: implications for the pathophysiology of schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry*, 2002; 7:663-4.
30. MOGHADDAM, B.; ADAMS B.; VERMA, A.; DALY, D. Activation of glutamatergic neurotransmission by ketamine: a novel step in the pathway from NMDA receptor blockade to dopaminergic and

- cognitive disruptions associated with the prefrontal cortex. **J Neurosci**, 1997; 8:2921-7.
31. KLISHIN, A.; LOZOVAYA, N.; KRISHTAL, O. Persistently enhanced ratio of NMDA and non-NMDA components of rat hippocampal EPSC after block of A1 adenosine receptors at increased $[Ca^{+2}]_o/[Mg^{+2}]_o$. **Neurosci Lett**, 1994; 179:132-6.
 32. TAMMINGA, C.A. Schizophrenia and glutamatergic transmission. **Crit Rev Neurobiol**, 1998; 12:21-36.
 33. HOEHN, K.; WHITE, T.D. Role of excitatory amino acid receptors in K^+ - and glutamate-evoked release of endogenous adenosine from rat cortical slices. **J Neurochem**, 1990; 54:256-265.
 34. CRAIG, C.G.; WHITE, T.D. NMDA – and non-NMDA-evoked adenosine release from rat cortical slices: distinct purinergic sources and mechanisms of release. **J Neurochem**, 1993; 60:1073-1080.
 35. DELANEY, S.M.; SHEPEL, P.N.; GEIGER, J.D. Levels of endogenous adenosine in rat striatum I. Regulation by ionotropic glutamate receptors, nitric oxide and free radicals. **J Pharmacol Exp Ther**, 1998; 285:561-567.
 36. USHIJIMA, I.; KATSURAGI, T.; FURUKAWA, T. Involvement of adenosine receptor activities in aggressive responses produced by clonidine in mice. **Psychopharmacology (Berl)**, 1984; 83:335-339.
 37. LARA, D.R.; SOUZA, D.O. Modelo de hipofunção adenosinérgica: interação com os sistemas dopaminérgicos e glutamatérgico. **Revista de Psiquiatria Clínica**, 2001; 28:60-69.
 38. LARA, D.R.; DALL'IGNA, O.P.; GHISOLFI, E.S.; BRUMSTEIN, M.G. Involvement of adenosine in the neurobiology of schizophrenia and its therapeutic implications. **Prog Neuro-Psych & Biol Psych**, 2006; 617-629.
 39. ZAGNONI, P.G.; BIANCHI, A.; ZOLO, P., et al. Allopurinol as add-on therapy in refractory epilepsy: a double-blind placebo-controlled randomized study. **Epilepsia**, 1994; 35:107-112.
 40. MACHADO-VIEIRA, R.; LARA, D.R.; SOUZA, D.O., et al. Therapeutic efficacy of allopurinol for mania associated to

- hyperuricemia (letter). *J Clin Psychopharmacol*, 2001; 21:621-622.
41. LARA, D.R.; BELMONT-DE-ABREU, P.; SOUZA, D.O., et al. Allopurinol for the treatment of refractory aggression and self-inflicted behavior. *J Psychopharmacol*, 2000; 14:81-83.
 42. LARA, D.R.; CRUZ, M.R.; XAVIER, F., et al. Allopurinol for the treatment of aggressive behavior in patients with dementia. *Int Clin Psychopharmacol*, 2003; 18:53-55.
 43. BRUNSTEIN, M.G.; GHISOLFI, E.S.; RAMOS, F.L.P.; LARA, D.R.. A clinical trial of adjuvant allopurinol therapy for moderately refractory schizophrenia. *J Clin Psiquiatria*, 2005; 66:213-219.
 44. AKHONDZADEH, Shahin; SAFARCHERATI, Anosheh; AMINI, Homayoun. Beneficial antipsychotic effects of allopurinol as add-on therapy for schizophrenia: a double blind, randomized and placebo controlled trial. *Prog Neuro-Psych & Biol Psych*, 2005; 29:253-259.
 45. LARA, D.R.. Inhibitory deficit in schizophrenia is not necessarily a GABAergic deficit. *Cell Mol Neurobiol*, 2002; 22:239-247.
 46. BROWNE, R.G.; NELCH, W.M.. Stereoselective antagonism of phencyclidine's discriminative properties by adenosine receptor agonists. *Science*, 1982; 217:1157-1159.
 47. ANDIN, P.; WIDERMARK, N.; AXELSSON, R. et al. Characterization of MK-801-induced behavior as a putative rat model of psychosis. *J Pharmacol Exp Ther*, 1999; 290:1393-1408.
 48. NYHAN, W.L.. The recognition of Lesh-Nyhan syndrome as an inborn error of purine metabolism. *J Inherit Metab Dis*, 1997; 20:171-178.
 49. MATEOS, F.A.; PUIG, J.G.; JIMENEZ, M.L., et al. Hereditary xanthinuria: evidence for enhanced hypoxanthine salvage. *J Clin Invest*, 1987; 79:847-852.
 50. LEWIS, D.A.; LEVITT, P.S.. Schizophrenia as a disorder of neurodevelopment. *Annu Rev Neurosci*, 2002:409-32.
 51. BULLMORE, E.T.; FRANGOU, S.; MURRAY, R.M.; McCARLEY, R.W.. The dysplastic net hypothesis: an integration of developmental and dysconnectivity theories of schizophrenia.

- Schizophr Res**, 1997; 2-3:143-56.
52. SHENTON, M.E.; DICKEY, C.C.; FRUMIN, M.; McCARLEY, R.W.. A review of MRI findings in schizophrenia. **Schizophr Res.**, 2001; 1-2:1-52.
 53. CUNHA, R.A.. Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. **Neurochem Int**, 2001; 2:107-25.
 54. DUNWIDDIE, T.V.; MASINO, S.A.. The role and regulation of adenosine in the central nervous system. **Annu Rev Neurosci**, 2001:31-55.
 55. TURNER, C.P., YAN, H.; SCHWARTZ, M.; OTHMAN, T.; RIVKEES, S.A.. A1 adenosine receptor activation induces ventriculomegaly and white matter loss. **Neuro Report**, 2002; 9:1199-204.
 56. TURNER, C.P.; SELI, M.; MENT, L.; STEWART, W.; YAN, H.; JOHANSSON, B., et al.. A1 adenosine receptors mediate hypoxia-induced ventriculomegaly. **Proc Natl Acad Sci USA**, 2003; 20:11718-22.
 57. DAVIS, K.L.; STEWART, D.G.; FRIEDMAN, J.I.; BUCHSBAUM, M.; HARVEY, P.D.; HOF, P.R., et al. White matter changes in schizophrenia: evidence for myelin-related dysfunction. **Arch Gen Psychiatry**, 2003; 5:443-56.
 58. GOGTAY, N.; SPORN, A.; CLASSEN, L.S; NUGENT III, T.F.; GREENSTEIN, DINICOLSON, R., et al.. Comparison of progressive cortical gray matter loss in childhood-onset schizophrenia with that in childhood-onset atypical psychoses. **Arch Gen Psychiatry**, 2004; 1:17-22.
 59. LIEBERMAN, J.; CHAKOS, M.; WU, H.; ALVIR, J.; HOFFMANN, E.; ROBINSON, D., et al. Longitudinal study of brain morphology in first episode schizophrenia. **Biol Psychiatry**, 2001; 6:487-99.
 60. JOHANSSON, B.; HALLDNER, L.; DUNWIDDIE, T.V.; MASINO, S.A.; POELEHEN, W.; GIMENEZ-LLORT, L., et al.. Hyperalgesia, anxiety, and decreased hypoxic neuroprotection in mice lacking the adenosine A1 receptor. **Proc Natl Acad Sci USA**, 2001; 16:9407-

12.

61. de MENDONÇA, A.; SEBASTIÃO, A.M.; RIBEIRO, J.A.. Adenosine: Does it have a neuroprotective role after all? ***Brain Res Brain Res Rev***, 2000; 2-3:258-74.
62. TSUTSUI, S.; SOHNERMANN, J.; NOOR BAKHSH, F.; HENRY, S.; YOUNG, V.N.; WINSTON, B.W., et al. A1 adenosine receptor upregulation and activation attenuates neuroinflammation and demyelination in a model of multiple sclerosis. ***J Neurosci***, 2004; 6:1521-9.
63. NEHLIG, A.; DAVAL, J.L.; DEBRY, G.. Caffeine and the central nervous system: mechanisms of action, biochemical, metabolic and psychostimulant effects. ***Bain Res Brain Res Rev***, 1992; 2:139-70.
64. GUILLERT, R.. Neonatal caffeine exposure alters adenosine receptor control of locomotor activity in development rat. ***Dev Pharmacol Ther***, 1990; 2:94-100.
65. DORIAN, J.F.; HUMBERT, A.C.; DAVAL, J.L.. Bain maturation of high-affinity adenosine A2 receptors and their coupling to G-proteins. ***Bain Res Dev Brain Res***, 1996; 1-2:1-9.
66. JOHANSSON, R.; GEORGIEV, V.; LINDSTROM, K.; FREDHOLM, B.B.. A1 and A2 adenosine receptors and A1 mRNA in mouse brain: effect of long-term caffeine treatment. ***Brain Res***, 1997; 1-2:153-64.
67. MARANGOS, P.J.; PATEL, J.; STIVERS, J.. Ontogeny of adenosine binding sites in rat forebrain and cerebellum. ***J Neurochem***, 1982; 1:267-70.
68. FREDHOLM, B.B; BATTIG, K; HOLMEN, J.; NEHLIG, A.; ZVARTAU, E.E.. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. ***Pharmacol Rev***, 1999; 1:83-133.
69. FRANCO, R.; CASADO, V.; CIRUELA, F.; SAURA, C.; MALLOL, J.; CANELA, E.I.; LLUIS, C.. Cell surface adenosine deaminase: much more than ectoenzyme. ***Prog Neurobiol***, 1997; 52:283-294.
70. CIRUELA, F.; SAURA, C.; CANELA, E.I.; MALLOL, J.; LLUIS, C.; FRANCO, R.. Adenosine deaminase affects ligand-induced

signaling by interacting with cell surface adenosine receptors.

FEBS Let, 1996; 380:219-223.

71. TISCHFIELD, J.A.; CREAGAN, R.P.; NICHOLS, E.A.; RUDDLE, F.H.. Assignment of a gene for adenosine deaminase to human chromosome 20. **Hum Hered**, 1974; 24:1-11.
72. PHILLIP, T.; FRAISSE, J.; HAMET, N.; LAURAS, B.; LENOIR, G.; PHILLIP, I.; ROLLAND, M.O.. Regional assignment of the ADA locus 20q13.2 qtr by gene dosage studies. **Cytogenet Cell Genet**, 1980; 27:187-189.
73. PETERSEN, M.B.; TRANEBJAERG, L.; TOMMERUP, N.; NYGAARD, P.; EDWARDS, H.. New assignment of the adenosine deaminase gene locus to chromosome 20q13.11 by study of a patient with interstitial deletion 20q. **J Med Genet**, 1987; 24:93-96.
74. DADDONA, P.E.; SHEWACH, D.S.; KELLEY, W.N.; ARGOS, P.; MARKHAM, A.F.; ORKIN, S.H.. Human adenosine deaminase: cDNA and complete primary sequence. **J Biol Chem**, 1984; 259:12101-12106.
75. INGOLIA, D.E.; AL-UBAIDI; BIGO, H.A.M.R.; KELLENS, R.E.; WRIGHT, D.; YEUNG, C.Y.. Molecular cloning of the murine adenosine-deaminase gene from a genetically enriched source: identification and characterization of promoter region. **Mol Cell Biol**, 1986; 6:4458-4466.
76. HIRSCHHORN, R.; YANG, D.R.; ISRANI, A.. An Asp8Asn substitution results in adenosine deaminase (ADA) genetic polymorphism (ADA-2 allozyme). Occurrence on different chromosomal backgrounds and apparent intragenic crossover. **Ann Hum Genet**, 1994; 58:1-9.
77. SACCUCCI, P.; ARPINO, C.; RIZZO, R.; GAGLIANO, A.; VALZONE, A.; LALLI, C.; GALASSO, C.; CURATOLO, P.. Association of Adenosine Deaminase Polymorphism with Mild Mental Retardation. **J Child Neurol**, 2006; 21 (9): 753-756.
78. ZAVIALOV, A.V.; ENGSTRÖM, Å.. Human ADA2 belongs a new family of growth factor with adenosine deaminase activity. **Biochem J**, 2005; 391:51-57.

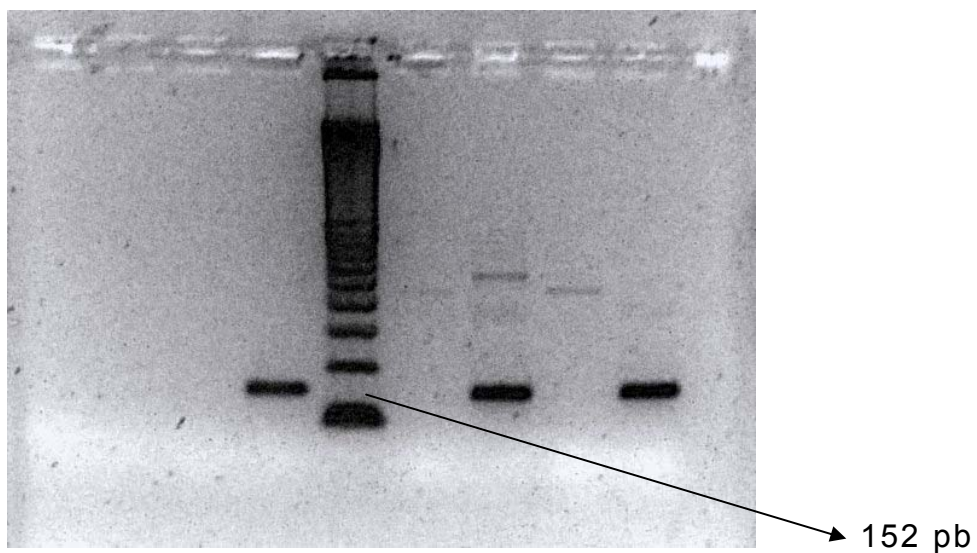
79. RÉTEY, J.V.; ADAM, M.; HONEGGER, E.; KHATAMI, R.; LUHMANN, U.F.O.; JUNG, H.H.; BERGER, W.; LANDOLT, H.P.. A functional genetic variation of adenosine deaminase affects the duration and intensity of deep sleep in humans. ***PNAS***, 2005; 102(43):15676-15681.
80. SPENCER, N.; HOPKINSON, D.A.; HARRIS, H.. ***Ann Hum Genet***, 1968; 32:9-14.
81. PERSICO, A.M.; MILITERNI, R.; BRAVACCIO, T.; PUGLISI-ALLEGRA, S., et al.. Adenosine deaminase alleles and autistic disorder: case-control and family-based. ***Am J Med Genet***, 2000; 96:784-790.
82. BATTISTUZZI, G.; LUDICONE, P.; SANTOLAMAZZA, P.; PETRUCCI, R.. Activity of adenosine deaminase allelic forms in intact erythrocytes and lymphocytes. ***Ann Hum Genet***, 1981; 45:15-19.
83. RADULOVACKI, M.. Adenosine sleep theory: how I postulated it. ***Neurol Res***, 2005; 27:137-138.
84. BOTTINI, N; DELUCA, D.; SACUCCI, P.; FIUMARA, A.; ELIA, M.; PORFIRIO, M.C.; LUCARELLI, P.; CURATOLO, P.. Autism: evidence of association with adenosine deaminase genetic polymorphism. ***Neurogenetics***, 2001; 3:111-113.
85. PARTINEN, M.; KAPRIO, J.; KOSKENVUO, M.; PUTKONEN, P.; LANGINVAINIO, H.. Genetic and environmental determination of human sleep. ***Sleep***, 1983; 6:179-185.
86. TUATHAIGH, C.M.P; BABOVIC, D.; O'MEARA, G.; CLIFFORD, J.J.; CROKE, D.T.; WADDINGTON, J.L.. Susceptibility genes for schizophrenia: Characterization of mutant mouse models at the level of phenotypic behavior. ***Neurosci Biobeha Rev***, 2006; Jun 16.
87. LEWIS, C.M.; WISE, L.H.; DeLISI, L.E., et al. Genome scan meta-analysis of schizophrenia and bipolar disorder, part II: Schizophrenia. ***American Journal of Human Genetics***, 2003;

73:34-48.

ANEXOS

ANEXO 1. Exemplo da visualização da eletroforese em gel de agarose 2% dos genótipos homozigotos resultantes da PCR alelo específica (visualização com Brometo de Etídio e luz ultravioleta)

MA MG 1A 1G Mpb 2A 2G 3A 3G



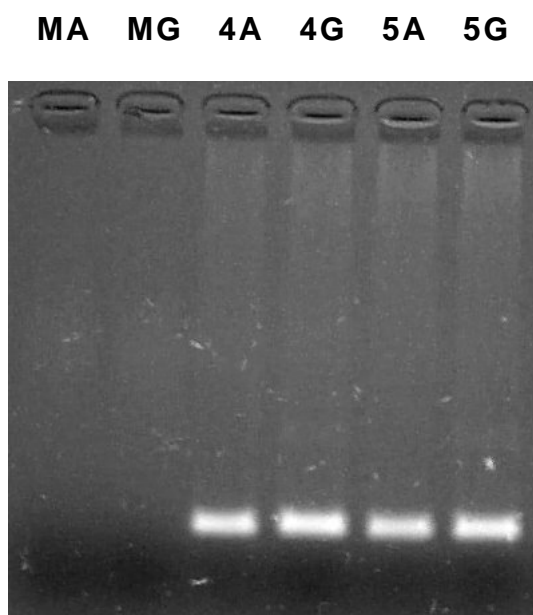
Genótipos encontrados:

1> GG

2> GG

3> GG

ANEXO 2. Exemplo da visualização da eletroforese em gel de agarose 2% dos genótipos heterozigotos resultantes da PCR alelo específica (visualização com Gel Red e luz ultravioleta).



Genótipos encontrados:

4> AG

5> AG