

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA

Amanda da Silva

**EFEITOS DOS ANTIPSICÓTICOS RISPERIDONA E HALOPERIDOL SOBRE
PARÂMETROS GLIAIS EM FATIAS HIPOCAMPAIS E EM CULTURA DE
ASTRÓCITOS DE HIPOCAMPO DE RATOS WISTAR**

Porto Alegre

2020

Amanda da Silva

**EFEITOS DOS ANTIPSICÓTICOS RISPERIDONA E HALOPERIDOL SOBRE
PARÂMETROS GLIAIS EM FATIAS HIPOCAMPAIS E EM CULTURA DE
ASTRÓCITOS DE HIPOCAMPO DE RATOS WISTAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. André Quincozes dos Santos

Porto Alegre

2020

CIP - Catalogação na Publicação

Silva, Amanda da
Efeitos dos antipsicóticos risperidona e
haloperidol sobre parâmetros gliais em fatias
hipocâmpais e em cultura de astrócitos de hipocampo de
ratos Wistar / Amanda da Silva. -- 2020.
77 f.
Orientador: André Quincozes dos Santos.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2020.

1. Astrócitos. 2. Haloperidol. 3. Risperidona. 4.
Metabolismo astrocitário. 5. Neuroinflamação. I.
Santos, André Quincozes dos, orient. II. Título.

"O aspecto mais triste da vida neste momento preciso é que a ciência reúne conhecimento mais rapidamente do que a sociedade reúne sabedoria"

Isaac Asimov

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a muitas pessoas pela realização deste trabalho, pois sem as quais isto não seria possível. Além do grande esforço pessoal empreendido ao longo dessa jornada muitas escolhas foram feitas e abdições foram necessárias para que os objetivos fossem alcançados.

Ao meu esposo Alexandre pela paciência de entender minha ausência, e de estar sempre ao meu lado fornecendo ajuda e apoio nos momentos mais difíceis deste processo, assim como, em outros momentos ao longo destes 15 anos.

À minha família, que sempre apoiou todas as minhas escolhas, livre de julgamentos, além de entender minha ausência, agradeço o apoio.

Ao meu orientador André, pela oportunidade e pelo incentivo em todos os momentos do desenvolvimento deste trabalho com atenção e parceria em todas as etapas, além da disponibilidade de me orientar e atender minhas dúvidas e demandas quando necessário.

Aos meus colegas de laboratório que tornaram minha vida mais divertida além do auxílio nos experimentos e companhia nos momentos de silêncio, em especial, a Larissa que empenhou muita dedicação para me auxiliar e orientar desde o início em todos os processos, dos experimentos a revisão do texto.

Aos meus amigos e colegas de trabalho, pela parceria e ajuda neste ano de incertezas e medos onde precisamos nos unir mais ainda para nos adaptar e superar os desafios do dia a dia.

Por fim agradeço pela minha vida, pela saúde que tenho para poder buscar meus objetivos e trilhar pelos caminhos que devo seguir.

Obrigada!

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	5
1.1 TRANSTORNOS NEUROPSIQUIÁTRICOS E ANTIPSICÓTICOS	5
1.2 HIPOCAMPO	6
1.3 ASTRÓCITOS.....	7
1.3.1 Metabolismo Glutamatérgico	8
1.3.2 Metabolismo da Glicose e Produção de Lactato.....	9
1.3.3 Suporte Trófico.....	10
1.3.4 Resposta Inflamatória	11
1.4 MECANISMOS ASSOCIADOS À FUNCIONALIDADE GLIAL.....	11
1.5 EFEITOS DOS ANTIPSICÓTICOS RISPERIDONA E HALOPERIDOL NO SNC.....	13
2 JUSTIFICATIVA	15
3 OBJETIVOS.....	17
3.1 OBJETIVO GERAL.....	17
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS EM FATIAS AGUDAS HIPOCAMPAS.....	17
3.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS EM CULTURA PRIMÁRIA DE ASTRÓCITOS.....	17
4 METODOLOGIA.....	19
4.1 ANIMAIS	19
4.2 PREPARAÇÃO E INCUBAÇÃO DAS FATIAS HIPOCAMPAS.....	19
4.3 CULTURA PRIMÁRIA DE ASTRÓCITOS DE RATOS ADULTOS	20
4.4 TRATAMENTOS.....	20
4.5 VIABILIDADE, INTEGRIDADE E MORFOLOGIA CELULAR	20
4.6 ATIVIDADE DA GLUTAMINA SINTETASE (GS)	21
4.7 CONTEÚDO DE GLUTATIONA REDUZIDA (GSH).....	21
4.8 DETERMINAÇÃO DE Na ⁺ K ⁺ -ATPase.....	22
4.9 <i>WESTERN BLOTTING</i>	22
4.10 EXTRAÇÃO DE RNA E RT-PCR QUANTITATIVO	23
4.11 NÍVEIS DE TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, BDNF, GDNF, TGF- β e S100B	23
4.12 DOSAGEM DE GLICOSE	24
4.13 DETERMINAÇÃO DE LACTATO.....	24
4.14 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS	24
4.15 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	24
5 RESULTADOS	25
5.1 VIABILIDADE CELULAR E METABOLISMO DA GLICOSE	25

5.2 METABOLISMO DO GLUTAMATO	27
5.3 Na ⁺ K ⁺ -ATPase	30
5.4 FATORES TRÓFICOS	31
5.5 RESPOSTA INFLAMATÓRIA	32
5.6 MECANISMOS DE SINALIZAÇÃO CELULAR	34
5.7 ANÁLISES EM CULTURA PRIMÁRIA DE ASTRÓCITOS HIPOCAMPAIS	39
5.8 RESUMO DOS RESULTADOS	43
6 DISCUSSÃO.....	44
7 CONCLUSÕES	54
PERSPECTIVAS	55
REFERÊNCIAS	56

RESUMO

O hipocampo é uma estrutura cerebral crucial para os processos de aprendizado e memória, e alterações na funcionalidade de células hipocâmpais podem estar associadas ao desenvolvimento de transtornos neuropsiquiátricos. Neste sentido, os astrócitos são células gliais responsáveis pela captação de glutamato, sendo este neurotransmissor associado aos processos cognitivos e mecanismos patobioquímicos de doenças neurológicas. Além disso, os astrócitos são responsáveis pelo suporte metabólico, manutenção da homeostase iônica, modulação da neurotransmissão sináptica, manutenção da barreira hematoencefálica, defesa antioxidante e resposta inflamatória. Antipsicóticos são fármacos utilizados para o tratamento de transtornos neuropsiquiátricos e podem modular importantes funções astrocíticas por mecanismos ainda pouco esclarecidos. Estes fármacos são classificados em típicos, como por exemplo, haloperidol, clorpromazina e flufenazina; e atípicos como a risperidona, clozapina e quetiapina, em função dos receptores cerebrais onde atuam. Estudos anteriores do nosso grupo, mostraram que estes antipsicóticos modulam parâmetros gliais em células C6. Neste sentido, fatias agudas de hipocampo podem ser utilizadas para o entendimento de mecanismos de forma integrada entre as células neurais. Além disso, o papel dos astrócitos de forma isolada pode ser avaliado a partir da utilização da cultura de astrócitos. Assim, este trabalho avaliou o efeito dos antipsicóticos risperidona e haloperidol em fatias agudas hipocâmpais e em cultura de astrócitos de ratos Wistar de 30 dias para melhor compreender os mecanismos de ação dos antipsicóticos sobre parâmetros neuroquímicos, celulares e moleculares. Foram realizados experimentos de viabilidade celular, parâmetros metabólicos, avaliação do metabolismo glutamatérgico, atividade da Na^+K^+ -ATPase, liberação de fatores tróficos, perfil inflamatório e mecanismos associados à funcionalidade glial. Os fármacos não alteraram a viabilidade celular tanto em fatias quanto em culturas, no entanto, houve alteração no metabolismo da glicose e lactato pelo haloperidol. Os antipsicóticos também modularam a liberação de fatores tróficos, como BDNF, GDNF e TGF- β , e os níveis das citocinas pró- e anti-inflamatórias, como IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IL-10. Mecanismos de sinalização também foram avaliados e observamos que os fármacos são capazes de modular vias como AMPK, Nrf2, HO-1 e NF- κ B, bem como os receptores de adenosina A2a. Nossos resultados indicam que o haloperidol parece desencadear um processo pró-inflamatório, com alterações no metabolismo energético e envolvimento de vias de sinalização citoprotetoras, enquanto a risperidona parece exercer um efeito anti-inflamatório relacionado às mesmas vias de sinalização. É importante destacar que a cultura de astrócitos hipocâmpais refletiu resultados observados em fatias. Dessa forma, concluímos que os antipsicóticos risperidona e haloperidol modulam diferentemente parâmetros neuroquímicos, celulares e moleculares, particularmente relacionados aos astrócitos. Tais ações podem estar associadas aos efeitos positivos e negativos destes fármacos, podendo futuramente ser levadas em consideração para a escolha do esquema terapêutico adotado em transtornos neuropsiquiátricos.

PALAVRAS-CHAVE: astrócitos, haloperidol, risperidona, metabolismo astrocítico, neuroinflamação.

ABSTRACT

Hippocampus is a crucial brain structure for learning and memory processes, and alterations in the functionality of hippocampal cells may be associated with the development of neuropsychiatric disorders. In this regard, astrocytes are glial cells responsible for the uptake of the neurotransmitter glutamate, which is associated with cognitive processes and pathobiochemistry mechanisms of neurologic diseases. In addition, astrocytes are responsible for the metabolic support, maintenance of ionic homeostasis, modulation of synaptic neurotransmission, maintenance of brain-blood barrier, antioxidant defense and inflammatory response. Antipsychotics are drugs used for the treatment of neuropsychiatric disorders and can modulate important astrocytic functions by mechanisms poorly understood. These drugs are subdivided as typical, such as haloperidol, chlorpromazine and fluphenazine; and atypical, risperidone, clozapine and quetiapine, depending on the brain receptors in which they act. Previous studies from our group have shown that these antipsychotics modulate glial parameters in C6 astroglial cells. In this sense, acute hippocampal slices can be used for understanding mechanisms in an integrative manner. Additionally, the particular role of astrocytes can be evaluated using astrocyte cultures. Therefore, this study evaluated the effect of the antipsychotics risperidone and haloperidol in acute hippocampal slices and in astrocyte culture from 30-days old Wistar rats to further understand the antipsychotics' mechanisms of action on neurochemical, cellular and molecular parameters. Experimental analyses of cellular viability, metabolic parameters, glutamate metabolism, Na⁺K⁺-ATPase activity, trophic factor release, inflammatory profile and mechanisms associated with glial functionality were performed. The drugs did not alter cellular viability both in slices and cultures, but there were changes in glucose and lactate metabolism caused by haloperidol. Antipsychotics also modulated the release of trophic factors, such as BDNF, GDNF and TGF- β , as well as the levels of pro- and anti-inflammatory cytokines, IL-1 β , TNF- α , IL-6 and IL-10. Signaling mechanisms were also evaluated and we observed that the drugs are able to modulate pathways such as AMPK, Nrf2, HO-1 and NF-kB, and the adenosine receptor A2a. Our results indicate that haloperidol can trigger a pro-inflammatory process, with alterations in energy metabolism and involvement of cytoprotective signaling pathways, while risperidone seems to exert an anti-inflammatory effect related to the same signaling pathways. It is important to note that hippocampal astrocyte cultures reflected the results observed in slices. Thus, we conclude that the antipsychotics risperidone and haloperidol differentially modulate neurochemical, cellular and molecular parameters, particularly related to astrocytes. Such actions can be associated with the positive and negative effects of these drugs, and can be considered in the future to the choice of the therapeutic approach in neuropsychiatric disorders.

KEYWORDS: astrocytes, haloperidol, risperidone, astrocyte metabolism, neuroinflammation.

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPK	Proteína cinase ativada por AMP
ATP	Adenosina trifosfato
BDNF	Fator neurotrófico derivado do encéfalo (do inglês " <i>Brain-derived neurotrophic factor</i> ")
BHE	Barreira hematoencefálica
EAAT	Transportador de aminoácidos excitatórios (do inglês " <i>Excitatory amino acid transporter</i> ")
ERO	Espécies reativas de oxigênio
HIF-1 α	Fator 1-alfa induzível por hipóxia (do inglês " <i>Hypoxia-inducible factor 1-alpha</i> ")
HMGB1	Proteína de alta mobilidade box 1 (do inglês " <i>High mobility group box 1</i> ")
GCL	Glutamato-cisteína ligase
GDNF	Fator neurotrófico derivado da glia (do inglês " <i>Glial-derived neurotrophic factor</i> ")
GFAP	Proteína glial fibrilar ácida (do inglês " <i>Glial fibrillary acidic protein</i> ")
GLAST	Transportador de glutamato-aspartato (do inglês " <i>Glutamate- aspartate transporter</i> ")
GLT-1	Transportador de glutamato 1 (do inglês " <i>Glutamate transporter 1</i> ")
GLUTs	Transportadores de glicose (do inglês " <i>Glucose transporters</i> ")
GS	Glutamina sintetase
GSH	Glutationa reduzida
HO-1	Heme oxigenase 1
IL-1 β	Interleucina 1 β

IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
LTP	Potenciação de longo prazo
MAPK	Proteína cinase ativada por mitógenos (do inglês " <i>Mitogen- activated protein kinase</i> ")
MCT	Transportador de monocarboxilato
mTOR	Proteína alvo da rapamicina em mamíferos (do inglês " <i>Mammalian target of rapamycin</i> ")
NF- κ B	Fator de transcrição nuclear κ B (do inglês " <i>Nuclear factor κB</i> ")
NO	Óxido nítrico
Nrf-2	Fator eritróide nuclear 2 relacionado ao fator 2 (do inglês " <i>Nuclear factor erythroid-derived 2-like 2</i> ")
PGC-1 α	Coativador-1 alfa do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama
PI3K	Fosfatidil-inositol-3-cinase (do inglês " <i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i> ")
SNC	Sistema nervoso central
TEA	Transtorno do espectro autista
TGF- β	Fator de transformação de crescimento β (do inglês " <i>Transforming growth factor β</i> ")
TNF- α	Fator de necrose tumoral α (do inglês " <i>Tumor necrosis factor α</i> ")

1 INTRODUÇÃO

1.1 TRANSTORNOS NEUROPSIQUIÁTRICOS E ANTIPSICÓTICOS

Alterações no desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC) podem desencadear distúrbios neuronais causadores de sintomatologia neuropsiquiátrica. O sistema imunológico quando em desequilíbrio, apresenta um papel importante no desenvolvimento destes transtornos, como a esquizofrenia e transtorno do espectro autista (TEA) (BODNAR et al., 2020). É importante salientar que a ativação da imunidade materna pode levar a anormalidades do desenvolvimento no SNC. Infecções agudas graves ou crônicas podem ocasionar mudanças estruturais durante o desenvolvimento do sistema nervoso, contribuindo assim para o aparecimento de transtornos neuropsiquiátricos (GARAY, MCALLISTER, 2010).

Estudos mostram alterações imunológicas como características comuns de distúrbios no desenvolvimento neurológico, como por exemplo no TEA, e essas alterações podem ser detectadas desde a infância até a idade adulta (ROSE; ASHWOOD, 2014). Além disso, alterações em citocinas estão sendo consideradas como potenciais marcadores biológicos na esquizofrenia (BODNAR et al., 2020). Ainda não é esclarecido o papel da inflamação nos transtornos neuropsiquiátricos, mas estudos demonstram que as células gliais, que participam da resposta inflamatória no SNC, podem influenciar a formação e maturação das sinapses, sugerindo seu envolvimento nestas patologias (PETRELLI; PUCCI; BEZZI, 2016).

Os transtornos psiquiátricos afetam a qualidade de vida dos indivíduos (SANTOS; SIQUEIRA, 2010) e o tratamento consiste no uso de fármacos como os antipsicóticos, que melhoram os sintomas de psicose, os distúrbios sociais, comportamentais, de concentração e memória (SILVA, 2006). Estes fármacos podem ser classificados em típicos e atípicos em função dos receptores cerebrais onde atuam. Os antipsicóticos típicos, como por exemplo, haloperidol, clorpromazina e flufenazina, atuam principalmente em receptores dopaminérgicos; enquanto os atípicos, como risperidona, clozapina e quetiapina, não apenas nos receptores dopaminérgicos, mas também nos receptores serotoninérgicos (LI; SNYDER; VANOVER, 2016).

Neste sentido, importantes alterações observadas no córtex e no hipocampo, bem como, a reatividade glial, estão associadas à patogênese dos transtornos neuropsiquiátricos (MOLOFSKY et al., 2012), sendo então estes elementos fundamentais para o estudo da ação dos antipsicóticos.

1.2 HIPOCAMPO

Celularmente, o SNC é formado por neurônios e células gliais. Os neurônios são a unidade funcional básica no SNC com a função de receber, integrar, armazenar e transportar informações através das conexões sinápticas para os órgãos efetores (GUYTON, 2011; ABBAS, 2010). Por sua vez, as células gliais são fundamentais para manter a homeostasia do SNC, proporcionando suporte, proteção e manutenção metabólica para os neurônios (FELTEN; SHETTY, 2003). As células gliais são subdivididas em dois grandes grupos: a microglia e a macroglia, sendo esta composta por astrócitos, células endoteliais e oligodendrócitos (PEREA; ARAQUE, 2005). Os astrócitos representam mais de um terço da massa encefálica e são encontrados circundando sinapses e dendritos, respondendo por importantes funções hipocampais (FELTEN; SHETTY, 2003).

O hipocampo é uma estrutura cerebral que se origina no isocórtex como parte do quinto lobo límbico do cérebro e encontra-se entre o mesencéfalo e o aspecto medial do lobo temporal. Possui três zonas distintas: giro denteado, hipocampo e subículo. Existem quatro subcampos do hipocampo CA1, CA2, CA3 e CA4. A estrutura está intimamente associada aos corpos da amígdala e ao hipotálamo, de forma que qualquer estímulo proximal a estas estruturas estimula de forma indireta o hipocampo (ISOLAN et al., 2007).

Sua principal função envolve a formação de memória em um processo que apresenta três fases: (1) registro, (2) armazenamento e (3) recuperação de informações. Possui também mecanismos para converter a memória de curto prazo em memória de longo prazo, consolidando o pensamento verbal e simbólico em informações que podem ser acessadas para a tomada de decisões (FOGWE; REDDY; MESFIN, 2020). Constituído principalmente por células piramidais e granulares, as estruturas do hipocampo possuem neurônios e glia com funções diferenciadas (GONÇALVES; SCHAFER; GAGE, 2016).

1.3 ASTRÓCITOS

Os astrócitos são células da glia que possuem morfologia estrelada com múltiplos prolongamentos citoplasmáticos ramificados. O citoesqueleto astrocitário é constituído por proteínas de microfilamentos como a actina, de microtúbulos como a tubulina e de filamentos intermediários como a proteína glial fibrilar ácida (GFAP) e a vimentina. Esta estrutura é responsável por diversas funções fisiológicas, como a manutenção da forma celular, da citoarquitetura e da estabilidade mecânica (MENET et al., 2001; MIDDELDORP; HOL, 2011).

A actina é a principal determinante da morfologia celular e está envolvida na motilidade, migração e adesão celular e alterações na sua formação podem alterar funções reguladas pelos astrócitos como o crescimento celular e a captação de glutamato (KHAKH; SOFRONIEW, 2015). Dentre as proteínas que formam os filamentos intermediários, a GFAP é um importante marcador deste tipo celular. O aumento na expressão de proteínas do citoesqueleto contribui para a formação da cicatriz glial em situações de astrogliose reativa, mostrando sua atuação em processos patológicos (PEKNY et al., 2016).

A GFAP é a principal proteína constituinte dos filamentos intermediários nos astrócitos, responsável pela estrutura celular, pela manutenção da força mecânica e pelo suporte estrutural dado aos neurônios e à barreira hematoencefálica (BHE). Além disso, é um importante marcador para a identificação astrocitária por técnicas de imunocito/histoquímica (YOUNG, 2011). A vimentina é principalmente expressa em astrócitos imaturos tendo um papel essencial no desenvolvimento cerebral, sendo substituída progressivamente, porém não totalmente, pela GFAP ao longo do processo de diferenciação celular (BRAMANTI et al., 2010; PEKNY, 2001).

Além disso, os astrócitos desempenham importantes funções para a manutenção da homeostasia do SNC, sendo responsáveis pelo suporte aos neurônios através da formação da arquitetura celular, comunicação através do contato com os vasos sanguíneos, bem como pelo metabolismo energético, defesa antioxidante, homeostase iônica, resposta inflamatória, e síntese, secreção e liberação de fatores tróficos (BÉLANGER; ALLAMAN; MAGISTRETTI, 2011; BLASKO et al., 2004; WANG; BORDEY, 2008).

A interação na transmissão sináptica e plasticidade envolve a contribuição de neurônios pré, pós-sinápticos e astrócitos na configuração de uma sinapse tripartite.

Os astrócitos respondem à ativação pré-sináptica com sinais de Ca^{2+} , desencadeando a liberação de gliotransmissores, incluindo glutamato, adenosina trifosfato (ATP) e ácido gama-aminobutírico (GABA), que modulam a transmissão sináptica local (ARAQUE et al., 2014; HARADA; KAMIYA; TSUBOI, 2016). O glutamato derivado de astrócitos facilita a ativação do receptor de glutamato N-metil-D-aspartate (NMDA) nos sítios pós-sinápticos, facilitando a potenciação de longa duração na neurotransmissão (RUGGIERO et al., 2011).

1.3.1 Metabolismo Glutamatérgico

O glutamato é um aminoácido não-essencial, sendo também o neurotransmissor excitatório mais importante do SNC, com um papel chave nos processos de aprendizado e memória (WIBLE, 2013). Sua sinalização inicia após a ligação do glutamato a receptores ionotrópicos e/ou metabotrópicos e está fortemente associada ao cálcio. Além disso, o glutamato atua na formação e eliminação de sinapses, migração, diferenciação e morte neuronal, assim como na regulação do metabolismo energético (RUGGIERO et al., 2011). A liberação do glutamato para o meio extracelular é principalmente realizada pelos terminais sinápticos neuronais, mas também pode ser realizada pelos astrócitos no processo de gliotransmissão. No entanto, em condições patológicas, o acúmulo de glutamato na fenda sináptica pode desencadear o processo de excitotoxicidade neuronal (PARPURA; VERKHRATSKY, 2012).

Os astrócitos são responsáveis pela captação de glutamato liberado na fenda sináptica através de transportadores específicos. Em roedores, os principais transportadores são o transportador de glutamato/aspartato (GLAST) e o transportador de glutamato 1 (GLT-1), sendo eles homólogos aos transportadores de aminoácidos excitatórios EAAT1 e EAAT2, respectivamente (ROSE et al., 2018). Tais transportadores são dependentes de Na^+ . Neste sentido, a Na^+K^+ -ATPase é um sistema de transporte que possui a função de manter o gradiente eletroquímico de Na^+ através da membrana celular e controlar sua homeostase celular utilizando ATP. No entanto, a Na^+K^+ -ATPase também funciona como um receptor, transdutor de sinal e suporte através de interações proteína-proteína (LIU; LILLY; SHAPIRO, 2018).

O glutamato, após ser captado, pode ser convertido em glutamina pela enzima glutamina sintetase (GS), expressa exclusivamente em astrócitos no SNC, em uma

reação dependente de ATP. A glutamina então é transportada para os neurônios e reconvertida a glutamato pela glutaminase, formando assim o ciclo glutamato-glutamina (BAK; SCHOUSBOE; WAAGEPETERSEN, 2006; ROSE et al., 2018).

Outro possível destino para o glutamato é a ligação com os aminoácidos cisteína e glicina para a síntese da glutathiona reduzida (GSH), um antioxidante não-enzimático importante para a proteção do SNC contra danos gerados pelo estresse oxidativo. A enzima glutamato-cisteína ligase (GCL) conjuga o glutamato à cisteína. Após, a glutathiona sintase adiciona a glicina e finaliza a formação do tripeptídeo (DRINGEN; GUTTERER; HIRRLINGER, 2000). Os astrócitos apresentam níveis mais elevados de GSH do que os neurônios, desempenhando, portanto, um importante papel na defesa antioxidante do SNC (BÉLANGER; MAGISTRETTI, 2009; DRINGEN; GUTTERER; HIRRLINGER, 2000). Parte da GSH sintetizada pelos astrócitos é secretada para o meio extracelular, e pode ser utilizada como precursora para a síntese neuronal de GSH (BÉLANGER; ALLAMAN; MAGISTRETTI, 2011; DRINGEN; GUTTERER; HIRRLINGER, 2000; HERTZ, 2006).

1.3.2 Metabolismo da Glicose e Produção de Lactato

Quanto ao papel metabólico, os astrócitos participam do metabolismo energético através da captação de glicose ou via fornecimento de energia na forma de lactato para os neurônios, que o utilizam como um substrato energético (BÉLANGER; ALLAMAN; MAGISTRETTI, 2011). Assim, os astrócitos são responsivos a alterações nos níveis de glicose, fornecendo lactato ao espaço extracelular para captação pelos neurônios (PELLERIN, 2005).

Os astrócitos que circundam os capilares captam e transportam glicose para o cérebro, principalmente através do transportador de glicose 1 (GLUT-1). Existem duas isoformas do GLUT-1, uma forma mais glicosilada (GLUT-1 55 kDa), localizada nas células endoteliais vasculares, o que garante o transporte de glicose através da BHE e outra forma menos glicosilada (GLUT-1 45 kDa), localizada em astrócitos (JURCOVICOVA, 2014).

A glicose intracelular é fosforilada e pode ser armazenada na forma de glicogênio. No entanto, é principalmente metabolizada pela via glicolítica para a geração de energia, produzindo lactato, o qual é transportado para o meio extracelular

via transportador de monocarboxilato 1 (MCT1). A partir do meio extracelular, o lactato entra nos neurônios via MCT2, onde é convertido em piruvato, pela enzima lactato desidrogenase, e utilizado pelo ciclo do ácido tricarboxílico na produção de ATP (JURCOVICOVA, 2014).

1.3.3 Suporte Trófico

Os astrócitos participam dos processos de regeneração e proteção do sistema nervoso através da síntese, secreção e liberação de fatores neurotróficos, como a proteína S100B, o fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF), o fator neurotrófico derivado da glia (GDNF) e o fator de transformação de crescimento β (TGF- β) (MARAGAKIS; ROTHSTEIN, 2006; MARKIEWICZ; LUKOMSKA, 2006). Estes fatores tróficos são fundamentais para a sobrevivência, maturação e proliferação neuronal ao longo do desenvolvimento (VILLEGAS; POLETTA; CARRI, 2003).

A proteína S100B é produzida e secretada principalmente por astrócitos, apresentando funções tanto intra quanto extracelulares (DONATO et al., 2013). No meio intracelular, esta proteína ligante de cálcio estimula a proliferação, migração e diferenciação celular, participando também da modulação do citoesqueleto e da degradação de proteínas através da sinalização de segundos mensageiros, bem como interagindo com diferentes moléculas (DONATO et al., 2013; MICHETTI et al., 2019). No meio extracelular, essa proteína pode exercer tanto efeitos autócrinos quanto parácrinos sobre os neurônios e outras células da glia (DONATO et al., 2013).

O BDNF participa do desenvolvimento neuronal e na sobrevivência celular, apresentando um papel importante nos mecanismos moleculares da plasticidade sináptica (BINDER; SCHARFMAN, 2004), e o GDNF contribui para a formação de sinapses no hipocampo (PÖYHÖNEN et al., 2019), além de promover o desenvolvimento, sobrevivência e manutenção de neurônios dopaminérgicos (BUDNI et al., 2015). O TGF- β é uma proteína que controla a proliferação (ciclo celular), regulação do desenvolvimento e diferenciação celular, formação da matriz extracelular, angiogênese e resposta imune, apresentando grande importância na embriogênese, condições patológicas e reparo (DINIZ et al., 2019).

1.3.4 Resposta Inflamatória

Os astrócitos também participam das respostas imunes inatas e adaptativas no SNC. As projeções astrocitárias envolvem os capilares da BHE mediando respostas contra potenciais agentes infecciosos. Nos processos inflamatórios, os astrócitos podem alterar sua morfologia para envolver regiões do tecido que sofreram danos (IGLESIAS; MORALES; BARRETO, 2017).

A ativação astrocitária durante o dano tecidual neural está relacionada à expressão e secreção de citocinas pró-inflamatórias, como interleucina-1 β (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α), aumentando a permeabilidade da BHE e recrutando células imunes periféricas (XU et al., 2020). Além disso, os astrócitos são capazes de sintetizar alarminas, como a HMGB1 (do inglês *High mobility group box 1*). Este processo de ativação de astrócitos é denominada reatividade astrocitária e tem como objetivo o reparo tecidual e a formação da cicatriz astrocitária, que visa atenuar o dano neural. No entanto, é importante destacar que esta ativação pode causar a exacerbação da inflamação e aumento do dano (SOFRONIEW, 2015).

A interleucina-10 (IL-10) é uma citocina com funções anti-inflamatórias podendo suprimir respostas imunológicas, inibindo a liberação de mediadores pró-inflamatórios como TNF- α , IL-1 β e IL-6 (RUTZ; OUYANG, 2016). As citocinas e quimiocinas secretadas por astrócitos podem interagir com outras células ativando seus receptores e alterando vias de sinalização intracelulares (DEVERMAN; PATTERSON, 2009).

1.4 MECANISMOS ASSOCIADOS À FUNCIONALIDADE GLIAL

O astrócitos participam de diversos mecanismos de sinalização com outras células a fim de manter a homeostase local. Em eventos inflamatórios, os astrócitos podem responder através de receptores adenosinérgicos e de vias de sinalização como a do fator de transcrição nuclear κ B (NF- κ B) e da proteína cinase ativada por AMP (AMPK). Os receptores adenosinérgicos pertencem a uma família de receptores acoplados à proteína G que são ativados pela adenosina. Estes receptores podem modular respostas gliais associadas à inflamação através da diminuição da expressão

de genes envolvidos no processo inflamatório (BOBERMIN; ROPPA; QUINCOZES-SANTOS, 2019; GESSI et al., 2013).

O NF- κ B é considerado o principal mediador inflamatório por ser um regulador da transcrição de genes que codificam uma grande variedade de citocinas e quimiocinas (KARIN; DELHASE, 2000). Além disso, os astrócitos expressam receptores do tipo Toll (TLRs) que desencadeiam respostas imunológicas e liberação de moléculas pró-inflamatórias através da ativação de NF- κ B e de proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs), que também estão associadas ao processo inflamatório (GORINA et al., 2011).

Além disso, o NF- κ B possui atividade anti-apoptótica podendo contribuir também para a redução do processo inflamatório (LAWRENCE, 2009). Estudos demonstram que a nível sistêmico o NF- κ B pode ser ativado indiretamente pela sinalização da fosfatidil-inositol-3-cinase (PI3K), que está envolvida na via de transdução dos receptores TLR em células imunes, como macrófagos e células dendríticas. Esta interação e ativação de vias podem participar tanto na redução como no aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias (SÁNCHEZ-ALEGRÍA et al., 2018).

A família de cinases PI3K é expressa na maioria das células neurais do hipocampo, córtex cerebral e cerebelo em níveis elevados, possuindo um papel essencial na progressão do ciclo celular, sobrevivência, migração e crescimento celular (POMPURA; DOMINGUEZ-VILLAR, 2018). Assim, a sinalização envolvendo a PI3K, quando aumentada, pode contribuir para a tumorigênese (FRUMAN et al., 2017). A PI3K ativa a proteína cinase B, também conhecida como Akt, que desempenha papéis vitais no crescimento e diferenciação celular, metabolismo, inflamação e doenças neurodegenerativas (SÁNCHEZ-ALEGRÍA et al., 2018). A Akt também ativa a via da proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR), sendo essencial para neurônios em desenvolvimento e formação de sinapses contribuindo para a plasticidade neuronal e memória (HORWOOD et al., 2006).

Diretamente associada à função sináptica, a proteína sinaptofisina está presente nas membranas celulares, estando envolvida na introdução e recirculação de vesículas sinápticas na potenciação de longo prazo (LTP). Esta proteína é um importante marcador específico de terminais pré-sinápticos e sua expressão, assim como dos fatores tróficos, está relacionada à plasticidade cerebral (ZHU et al., 2019).

Embora as espécies reativas de oxigênio (ERO) sejam prejudiciais em excesso, são moléculas de sinalização celular importantes para a plasticidade sináptica. Associado a isso, a expressão do fator eritróide nuclear 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2), presente em maior nível em astrócitos do que em neurônios, atua para diminuir danos oxidativos através da regulação de centenas de genes antioxidantes. Enquanto uma superexpressão de Nrf2 por neurônios pode afetar o balanço oxidativo pela diminuição de ERO necessárias ao processo de plasticidade, a superexpressão de Nrf2 em astrócitos atenua aspectos da inflamação através da supressão de genes pró-inflamatórios (SIGFRIDSSON et al., 2018).

O Nrf2 responde ao estresse para regular positivamente genes protetores, incluindo os que codificam proteínas com papel antioxidante como a heme oxigenase 1 (HO-1) e a GCL, enzima limitante da síntese de GSH (LIDDELL, 2017). A HO-1, isoforma induzível da enzima de degradação do heme, possui um papel importante na inflamação pela sua capacidade de diminuir o processo inflamatório (VIJAYAN; WAGENER; IMMENSCHUH, 2018). Os produtos da HO-1, principalmente o monóxido de carbono, biliverdina e bilirrubina, também possuem ação antioxidante. Além disso, a HO-1 pode elevar o conteúdo de GSH, demonstrando seu papel na proteção celular em condições de estresse oxidativo (SCHIPPER et al., 2019).

A diminuição de energia mitocondrial também contribui para as respostas inflamatórias das células astrogliais através da regulação da expressão de genes inflamatórios e conseqüentemente da ativação da AMPK para restaurar os níveis de energia intracelulares (ASTAKHOVA et al., 2019; TOYAMA et al., 2016). O PGC-1 α (coativador-1 alfa do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama) é um regulador central da bioenergética celular, sendo induzido pela AMPK. Esta via de sinalização modula respostas de dano metabólico e oxidativo no SNC. A AMPK também regula expressão de GCL em astrócitos e, por meio da ativação do PGC-1 α , estimula a síntese de GSH promovendo atividade antioxidante (GUO et al., 2018).

1.5 EFEITOS DOS ANTIPSICÓTICOS RISPERIDONA E HALOPERIDOL NO SNC

O haloperidol é um antipsicótico típico de primeira geração utilizado principalmente pelo seu baixo custo, além de apresentar efeito bloqueador dos receptores dopaminérgicos centrais, sendo bastante eficiente para os sintomas positivos da esquizofrenia (alucinações e delírios). Porém, está frequentemente

envolvido no aparecimento de efeitos colaterais extrapiramidais como a discinesia tardia, o chamado “parkinsonismo” (LI; SNYDER; VANOVER, 2016; OLIVEIRA, 2000; SILVA, 2006).

Devido aos efeitos extrapiramidais do haloperidol, outros fármacos, como a risperidona, um antipsicótico atípico, foram desenvolvidos para proporcionar um tratamento mais efetivo. A risperidona é um antagonista seletivo dos receptores dopaminérgicos D2, responsáveis pela liberação de dopamina nos neurônios, que também possui afinidade pelos receptores serotoninérgicos 5HT2, contribuindo assim, para o equilíbrio entre dopamina e serotonina no cérebro (LI; SNYDER; VANOVER, 2016; OLIVEIRA, 2000; SILVA, 2006).

Esses fármacos podem modular funções neuronais e gliais por mecanismos ainda pouco conhecidos. Estudos do nosso grupo, mostraram que a risperidona aumentou a captação de glutamato, a atividade da GS, o conteúdo de GSH e a liberação de S100B em células C6 (QUINCOZES-SANTOS et al., 2008, 2009, 2010), apresentando também efeito antioxidante, enquanto o haloperidol apresentou efeito pró-oxidante (BOBERMIN et al., 2018; QUINCOZES-SANTOS et al., 2010). Além disso, os antipsicóticos podem modular a resposta inflamatória através de vias de sinalização, como a do NF- κ B (MACDOWELL et al., 2013; MITCHELL; VARGAS; HOFFMANN, 2016; SUGINO et al., 2009) podendo apresentar efeitos anti- ou pró-inflamatórios, através da liberação de citocinas como a IL-10, TNF- α e IL-1 β (BOBERMIN et al., 2018).

2 JUSTIFICATIVA

Nos transtornos neuropsiquiátricos podem ocorrer disfunção hipocampal e comprometimento da memória, visto que o hipocampo e estruturas relacionadas são essenciais para a cognição. Além disso, o hipocampo pode apresentar alterações de volume e de funcionalidade. Neste sentido, alterações corticais de funcionalidade perceptiva podem ocorrer devido a comunicação entre o hipocampo e regiões do córtex (WIBLE, 2013).

Em algumas condições neuropsiquiátricas uma interrupção na regulação aferente do sistema dopaminérgico compromete seu funcionamento tornando este sistema hiperativo e desregulado com possível perda de interneurônios. Os antipsicóticos atuam nas sinapses regulando o excesso de dopamina e serotonina liberados na fenda sináptica que causam a sintomatologia característica destas condições. No hipocampo, os antipsicóticos atuam no bloqueio dos receptores dopaminérgicos diminuindo sua hiper-responsividade e diminuindo os sintomas psicóticos (GRACE; GOMES, 2019). Além disso, interferem na remodelação neuronal ativando fatores de transcrição que regulam a expressão de genes relacionados à neurogênese e a proliferação de células gliais promovendo plasticidade na região alterada (KEILHOFF; FUSAR-POLI; BECKER, 2012).

Considerando que a administração de antipsicóticos geralmente se faz a longo prazo, e tanto transtornos neuropsiquiátricos quanto antipsicóticos podem acarretar alterações hipocampais, faz-se necessário o melhor entendimento destes fármacos sobre a funcionalidade glial hipocampal. Neste sentido, fatias agudas de hipocampo apresentam a citoarquitetura e os circuitos sinápticos bem estabelecidos e estruturados e, portanto, são amplamente utilizadas como ferramenta de estudo por apresentarem um menor tempo e custo de manutenção e manterem o padrão de conexões minimamente alterado com relação aos modelos *in vivo* (NARDIN et al., 2009).

Culturas de astrócitos preparadas a partir de animais neonatos são amplamente utilizadas para caracterizar propriedades bioquímicas, farmacológicas e morfológicas do SNC (SKYTT et al., 2010). No entanto, o cérebro neonato apresenta células neurais com menor grau de diferenciação que o cérebro adulto, e portanto, não corresponde ao alvo terapêutico dos antipsicóticos, visto que doenças como a esquizofrenia se manifestam a partir do final da adolescência e início da fase adulta

(GOGTAY et al., 2011; SILVA, 2006). Portanto, a utilização da cultura de astrócitos de ratos adultos, que apresentam diferenciação celular e conexões sinápticas melhor estabelecidas (BELLAVÉR et al., 2014; SOUZA et al., 2013), pode contribuir para o entendimento do papel dos astrócitos em relação aos mecanismos neuroquímicos das doenças cerebrais, além de caracterizar estas células como potenciais alvos terapêuticos para tais condições.

Levando-se em consideração a ação dos antipsicóticos sobre a funcionalidade hipocampal, particularmente em relação a parâmetros astrogliais, e considerando a falta de estudos destes medicamentos sobre estes parâmetros no cérebro maduro, este trabalho se propôs a avaliar o efeito dos antipsicóticos risperidona e haloperidol em fatias hipocampais agudas e em cultura de astrócitos de ratos Wistar adultos.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos do haloperidol e da risperidona sobre parâmetros neuroquímicos, celulares e moleculares em fatias agudas de hipocampo e em culturas de astrócitos hipocâmpais de ratos Wistar de 30 dias de idade.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS EM FATIAS AGUDAS HIPOCÂMPAIS

- Avaliar a viabilidade celular de fatias agudas do hipocampo de ratos Wistar adultos tratadas com haloperidol e risperidona;
- Avaliar parâmetros metabólicos como a produção de lactato e o consumo de glicose;
- Avaliar o metabolismo glutamatérgico através da expressão dos transportadores GLAST e GLT-1, da atividade da GS, e dos níveis de GSH intra e extracelulares;
- Avaliar a atividade da Na⁺K⁺-ATPase;
- Dosar a liberação dos fatores tróficos BDNF, GDNF, TGF- β e S100B;
- Avaliar o perfil inflamatório através da dosagem dos níveis de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-6) e anti-inflamatória (IL-10), e da expressão de HMGB1;
- Avaliar mecanismos celulares através da expressão e/ou do conteúdo protéico de PI3K, AMPK, Nrf2, HO-1, NF- κ B, receptores de adenosina e sinaptofisina.

3.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS EM CULTURA PRIMÁRIA DE ASTRÓCITOS

- Avaliar a viabilidade e morfologia celular em culturas de astrócitos de hipocampo de ratos Wistar adultos tratadas com haloperidol e risperidona;
- Avaliar o metabolismo energético através da liberação de lactato;
- Avaliar a atividade da Na⁺K⁺-ATPase;
- Dosar a liberação dos fatores tróficos BDNF, GDNF e TGF- β ;

- Avaliar o perfil inflamatório através da dosagem dos níveis de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-6) e anti-inflamatória (IL-10);

4 METODOLOGIA

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar machos adultos (30 dias), provenientes e mantidos no Biotério do Departamento de Bioquímica da UFRGS. A manutenção dos animais foi realizada de acordo com as condições padrão adotadas pelo biotério e os animais foram alojados em caixa de policarbonato de 365x207x140, as quais foram forradas com maravalha com trocas realizadas 2 vezes por semana pelos funcionários do Biotério, que também forneceram ração padrão e água potável *ad libitum* para os roedores. O alojamento dos animais foi calculado de acordo com a Resolução Normativa número 15 do CONCEA que leva em consideração a área necessária para o bem-estar animal relacionado com seu respectivo peso. A temperatura da sala do Biotério é regulada em 22 ± 2 °C e os ratos foram mantidos em um ciclo de claro/escuro de 12 horas. Os cuidados com animais seguiram as diretrizes governamentais oficiais conforme a Federação das Sociedades Brasileiras para Biologia Experimental aprovadas pelo Comitê de Ética da UFRGS. O projeto teve aprovação pelo CEUA (nº 35557).

4.2 PREPARAÇÃO E INCUBAÇÃO DAS FATIAS HIPOCAMPAIS

Ratos com 30 dias de idade foram decapitados e os hipocampos foram rapidamente dissecados e fatiados, com base nos protocolos previamente padronizados (NARDIN et al., 2009; ZANOTTO et al., 2013). Fatias transversais (300 µm) do tecido foram obtidas utilizando um *McIlwain Tissue Chopper*. Uma fatia de hipocampo foi colocada em cada poço de uma placa de cultura de 24 poços. As fatias foram incubadas em 300 µL de tampão salina oxigenado contendo 120 mM de NaCl, 2 mM de KCl, 1 mM de CaCl₂, 1 mM de MgSO₄, 25 mM de HEPES, 1 mM de KH₂PO₄ e 10 mM de glicose, pH 7,4, à temperatura ambiente. O meio de incubação foi trocado a cada 15 min por tampão salina fresco à temperatura ambiente (mantido a 25 °C). Após um período de estabilização de 120 min, as fatias foram incubadas com os tratamentos por 1 h a 30 °C. Foram avaliados parâmetros celulares, neuroquímicos e moleculares a partir das fatias, assim como do sobrenadante recolhido dos poços.

4.3 CULTURA PRIMÁRIA DE ASTRÓCITOS DE RATOS ADULTOS

Foram utilizados ratos Wistar adultos de 30 dias. As culturas foram obtidas a partir do hipocampo, de acordo com os protocolos estabelecidos pelo laboratório (SOUZA, 2013; BELLAVER, 2016). Resumidamente, após a decapitação, o cérebro dos animais foi removido e, em ambiente asséptico, a estrutura do hipocampo foi dissecada. Durante a dissecação, o tecido foi mantido em HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*). Em seguida, as estruturas passaram por etapas de dissociação enzimática e mecânica e, também, por centrifugações. As células foram semeadas (300.000 células/cm²) em placas de 6 ou 24 poços previamente recobertas com poli-L-lisina, em meio de cultura DMEM/F12 (*Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12*) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e cultivadas em incubadora a 37 °C em uma atmosfera com 5% de CO₂ até a confluência (aproximadamente 21 dias *in vitro*).

4.4 TRATAMENTOS DE FATIAS HIPOCAMPAIS E CULTURA DE ASTRÓCITOS

O tratamento foi dividido em 3 grupos: (1) controle, (2) haloperidol, (3) risperidona. Primeiramente, foi realizada uma curva de doses com as fatias, onde foram incubadas com os fármacos nas seguintes concentrações: 0,001; 0,01; 0,1; 1 e 10 µM por 1 h a 30 °C. Após a realização da curva de doses, foram definidas 2 doses para a avaliação dos demais parâmetros nas fatias hipocampais e para o tratamento das culturas primárias. Assim, foram utilizadas as doses de 1 e 10 µM por 1h a 30 °C nas fatias agudas e por 24 h a 37 °C numa atmosfera de 5% de CO₂ nas culturas primárias.

4.5 VIABILIDADE, INTEGRIDADE E MORFOLOGIA CELULAR

A viabilidade celular foi determinada pelo método do sal de tetrazólio (MTT) tanto nas fatias como nas culturas. Este método avalia a viabilidade celular através da atividade das enzimas desidrogenases presentes principalmente nas mitocôndrias. Quando há a redução do MTT, a reação resulta na formação de um composto púrpura,

indicando que há atividade mitocondrial, e portanto, que as células estão viáveis (DE SOUZA et al., 2013; QUINCOZES-SANTOS et al., 2014). Células não viáveis não reagem com o MTT, não alterando a coloração da reação. Resumidamente, o MTT foi incubado a uma concentração final de 0,5 mg/mL a 30 °C durante 30 min nas fatias hipocâmpais ou a uma concentração final de 0,05 mg/mL a 37 °C e 5% de CO₂ durante 1 h nas culturas de astrócitos. O produto de formazan gerado durante a incubação foi solubilizado em dimetilsulfóxido (DMSO). Os valores de absorvância foram medidos em 560 e 630 nm. Os resultados foram expressos como uma porcentagem do controle. A integridade da membrana celular foi avaliada nas culturas pela incorporação de iodeto de propídio (IP), visualizando a fluorescência do composto por microscopia. Além disso, uma observação morfológica das culturas foi realizada utilizando microscopia em contraste de fase.

4.6 ATIVIDADE DA GLUTAMINA SINTETASE (GS)

Para realização desta técnica foi utilizado um protocolo previamente descrito por Dos Santos et al. (DOS SANTOS et al., 2006). Aos homogeneizados de fatias, foi adicionada a mistura de reação contendo: MgCl₂ 10 mM, L-glutamato 50 mM, tampão imidazol-HCl (pH 7,4) 100 mM, 2-mercaptoetanol 10 mM, hidroxilamina-HCl 50 mM e ATP 10 mM, e foi realizada uma incubação por 15 minutos (37 °C). Para interromper a reação, foi adicionada uma solução contendo cloreto férrico 370 mM, HCl 670 mM e ácido tricloroacético 200 mM. Após centrifugação, a absorvância do sobrenadante foi medida a 530 nm e comparada à absorvância obtida em uma curva-padrão com γ -glutamil hidroxamato tratada com cloreto férrico.

4.7 CONTEÚDO DE GLUTATIONA REDUZIDA (GSH)

Esta técnica foi realizada conforme protocolo descrito na literatura (BROWNE; ARMSTRONG, 1998). Resumidamente, as fatias foram homogeneizadas em tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 8,0) contendo 5 mM EDTA, e as proteínas foram precipitadas com ácido metafosfórico 1,7%. O meio extracelular das fatias também foi utilizado para dosagem de GSH extracelular, sendo diluído também com tampão fosfato de sódio (diluição 1:2). Após precipitação, ambos sobrenadantes foram

incubados com o-ftaldialdeído (1 mg/ml em metanol) em temperatura ambiente por 15 minutos. A fluorescência foi medida utilizando-se comprimentos de onda de excitação e emissão de 350 e 420 nm, respectivamente. A curva de calibração foi feita com solução padrão de GSH (0 – 500 μ M). O conteúdo de GSH intracelular foi expresso em nmol/mg proteína e o de GSH extracelular em nmol/ml.

4.8 DETERMINAÇÃO DE Na⁺K⁺-ATPase

A mistura da reação para o teste de atividade Na⁺K⁺-ATPase continha 5 mM de MgCl₂, 80 mM de NaCl, 20 mM de KCl e 40 mM de Tris – HCl, pH 7,4, em um volume final de 200 μ L. Após 10 min de pré-incubação a 37 °C, a reação foi iniciada pela adição de ATP a uma concentração final de 3 mM e foi incubada por 20 min. Os controles foram realizados sob as mesmas condições com a adição de 1 mM de ouabaína. A atividade de Na⁺K⁺-ATPase foi calculada pela diferença entre os dois ensaios (WYSE et al., 2000). O fosfato inorgânico liberado (Pi) foi determinado pelo método de Chan et al. (CHAN; DELFERT; JUNGER, 1986), e a atividade específica da enzima foi expressa como nmol de Pi liberado por min por mg de proteína.

4.9 WESTERN BLOTTING

Fatias de hipocampo foram lisadas em uma solução contendo SDS a 4%, EDTA 2 mM, Na₃VO₄ 1 mM, NaF 10 mM e Tris 50 mM – HCl (pH 6,8). As proteínas das amostras foram separadas por SDS/PAGE (20 μ g de proteína por amostra) e transferidas para membranas de nitrocelulose usando um aparelho de transferência semi-seca (1,2 mA/cm²; 1 h). As membranas foram bloqueadas com ovoalbumina a 2% em solução salina tamponada com Tris contendo Tween 20 (T-TBS) e depois incubadas overnight (4 °C) com anti-GLT-1 (1:2000, Abcam), anti-GLAST (1:2000, Abcam), anti-fosfo PI3K p85 (Tyr458)/p55(Tyr199) (1:2000, Cell Signaling), e anti-sinaptofisina (1:5000; Millipore). Em seguida, as membranas foram incubadas por 1 h em temperatura ambiente com IgG anti-camundongo (1:10000; GE Healthcare) ou IgG anti-coelho (1:10000; GE Healthcare) conjugado com peroxidase por 1 h. O sinal de quimioluminescência foi detectado em um sistema Image Quant LAS4010 (GE

Healthcare) usando um kit ECL (GE Healthcare). Os resultados são expressos como porcentagens em relação às condições de controle.

4.10 EXTRAÇÃO DE RNA E RT-PCR QUANTITATIVO

O RNA total foi isolado a partir das fatias de hipocampo e das culturas de astrócitos utilizando o reagente TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA). A concentração e a pureza do RNA foram determinadas espectrofotometricamente na razão de 260:280. Então, 1 µg de RNA total foi transcrito reversamente para obtenção do DNA complementar (cDNA) usando o kit de Transcrição Reversa de Alta Capacidade da Applied Biosystems™ em um volume de reação de 20 µL, de acordo com as instruções do fabricante. Os RNA mensageiros (RNAm) codificadores de HMGB1 (#Rn02377062_g1), Nrf2 (#Rn00582415_m1), HO-1 (#Rn01536933_m1), NF-kB p50 (#Rn01502266_m1), NF-kB p65 (#Rn01502266_m1), A1 (#Rn00567668_m1), A2a (#Rn00583935_m1), A2b (#Rn00567697_m1), A3 (#Rn00563680_m1), AMPK (#Rn00576935_m1) e β-actina (#Rn00667869_m1) foram quantificados usando o sistema de RT-PCR em tempo real e as sondas TaqMan listadas acima, adquiridas da Applied Biosystems. Os níveis de RNAm alvos foram normalizados pelos níveis de β-actina. Os resultados foram analisados empregando o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ e expressos em relação aos níveis das condições de controle.

4.11 NÍVEIS DE TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-10, BDNF, GDNF, TGF-β e S100B

Os níveis de TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-10, BDNF, GDNF e TGF-β foram avaliados no meio extracelular proveniente das fatias hipocâmpais e das culturas de astrócitos, utilizando kits comerciais de ELISA (Invitrogen, exceto para o GDNF, que foi proveniente da Abcam). O conteúdo de S100B foi quantificado pelo método de ELISA padronizado previamente (LEITE et al., 2008). As amostras foram incubadas com tampão tris por 2 h em placa pré-incubada com anti-S100B monoclonal (SH-B1). Após, IgG anti-S100B policlonal produzido em coelho foi incubado por 30 min e, então, um anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase foi incubado por mais 30 minutos. A reação colorimétrica com OPD foi medida em 492 nm. O valor da concentração de

S100B foi calculado a partir da comparação das absorvâncias das amostras com uma curva padrão de S100B, variando de 0,002 – 1 ng/mL.

4.12 DOSAGEM DE GLICOSE

A dosagem de glicose do meio extracelular (100 µL) foi avaliada por kit comercial da marca Labtest. Os resultados foram expressos em mmol/L.

4.13 DETERMINAÇÃO DE LACTATO

O ensaio de lactato foi realizado em 100 µL de meio extracelular usando um ensaio colorimétrico comercial da Bioclin. Os resultados foram expressos como porcentagens do valor de controle.

4.14 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

As proteínas foram quantificadas usando o método de Lowry (LOWRY et al., 1951) com albumina bovina sérica como padrão.

4.15 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados serão expressos como a média \pm desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes. As diferenças entre os grupos foram analisadas utilizando análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Tukey. Os valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos.

5 RESULTADOS

Inicialmente, serão apresentados os resultados obtidos em fatias hipocâmpais de ratos Wistar com 30 dias de idade. Posteriormente, serão apresentados os resultados em cultura primária de astrócitos de ratos Wistar da mesma idade, que foram utilizadas para avaliação específica de funções astrocíticas.

5.1 VIABILIDADE CELULAR E METABOLISMO DA GLICOSE

Inicialmente foi avaliada a viabilidade celular após o tratamento com antipsicóticos nas fatias hipocâmpais agudas através da metodologia de MTT. Não houve alteração significativa na redução do MTT (Fig. 1), indicando que as diferentes concentrações (0,001; 0,01; 0,1; 1 e 10 μM) de haloperidol e risperidona não foram capazes de alterar a viabilidade celular. A partir desta análise e em função de outros trabalhos mostrando resultados em doses mais elevadas (BOBERMIN et al., 2018), foram selecionadas as duas doses maiores (1 e 10 μM) para as demais determinações metodológicas .

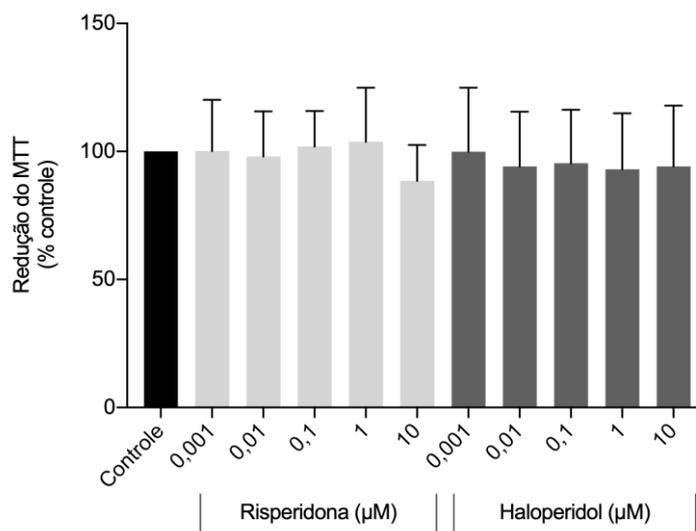


Figura 1: Efeitos da risperidona e do haloperidol na viabilidade celular. A atividade mitocondrial celular (medida pelo ensaio de redução do MTT) foi avaliada em fatias hipocâmpais após tratamentos com risperidona e haloperidol nas doses 0,001 - 10 μM por 1 h. Os dados são expressos como porcentagens em relação às condições controle e representam a média \pm desvio padrão de cinco determinações experimentais independentes, realizadas em triplicata. As diferenças entre os grupos foram analisadas estatisticamente usando ANOVA de uma via, seguido por um teste post-hoc de Tukey.

As células neurais utilizam a glicose circulante para obtenção de energia. O meio de estabilização do protocolo de fatias hipocâmpais agudas contém 10 mM de

glicose para suprir a demanda energética celular e mimetizar o ambiente celular para reduzir danos e manter as sinalizações celulares. Observou-se um consumo significativamente maior de glicose a partir do meio extracelular no tratamento com haloperidol 10 μM , $P < 0,0001$ (Fig. 2). No tratamento com a risperidona, assim como na dose de 1 μM de haloperidol, não houve alteração em comparação ao controle.

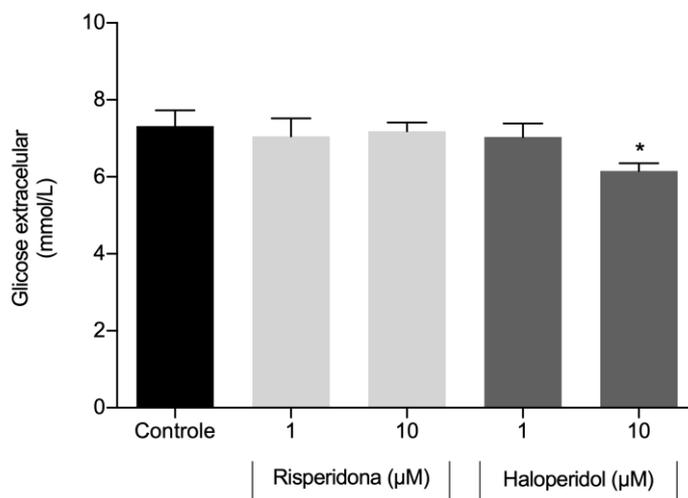


Figura 2: Efeitos da risperidona e do haloperidol no consumo celular de glicose. A glicose foi avaliada por kit comercial no meio extracelular de fatias hipocâmpais após tratamentos com risperidona e haloperidol nas concentrações de 1 e 10 μM por 1 h. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão de seis determinações experimentais independentes. As diferenças entre os grupos foram analisadas estatisticamente usando ANOVA de uma via, seguido por um teste post-hoc de Tukey para comparações múltiplas. * indica diferença comparado às condições controle ($P < 0,05$).

O lactato é um produto do metabolismo da glicose (via glicolítica) e frente a possíveis danos pode estar aumentado, para suprir tais demandas energéticas (JHA; MORRISON, 2018). Nossos dados indicam um aumento significativo no tratamento com o haloperidol 10 μM quando comparado ao controle, $P = 0,006$ (Fig. 3), enquanto o tratamento com risperidona não demonstrou alteração significativa.

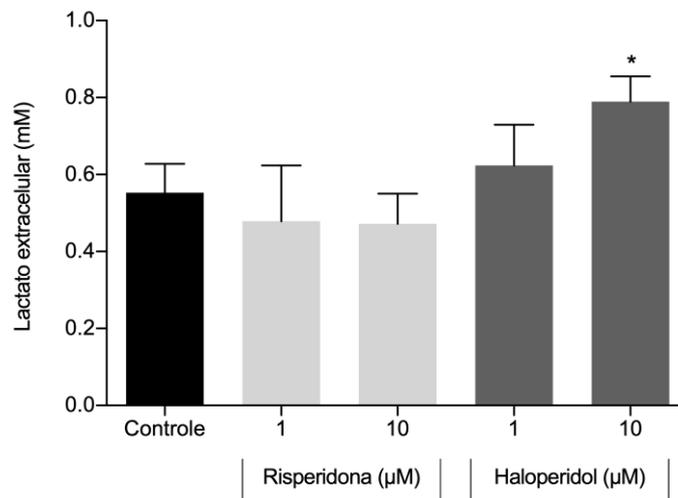


Figura 3: Efeito dos antipsicóticos sobre a liberação de lactato. O lactato foi avaliado por kit comercial no meio extracelular de fatias hipocâmpais após tratamentos com risperidona e haloperidol nas concentrações de 1 e 10 μM por 1 h. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão de seis determinações experimentais independentes. As diferenças entre os grupos foram analisadas estatisticamente usando ANOVA de uma via, seguido por um teste post-hoc de Tukey para comparações múltiplas. * indica diferença comparado às condições controle ($P < 0,05$).

5.2 METABOLISMO DO GLUTAMATO

Os transportadores de glutamato, GLAST e GLT-1, presentes nos astrócitos, estão envolvidos na manutenção das concentrações extracelulares fisiológicas de glutamato (PEREGO et al., 2000). Nossos resultados mostraram que não houve alteração significativa no imunoconteúdo do transportador GLAST, embora se observe uma aparente diminuição no tratamento com risperidona, particularmente na concentração de 1 μM . Quanto ao transportador GLT-1 não foi encontrada nenhuma alteração significativa nos tratamentos (Fig. 4).

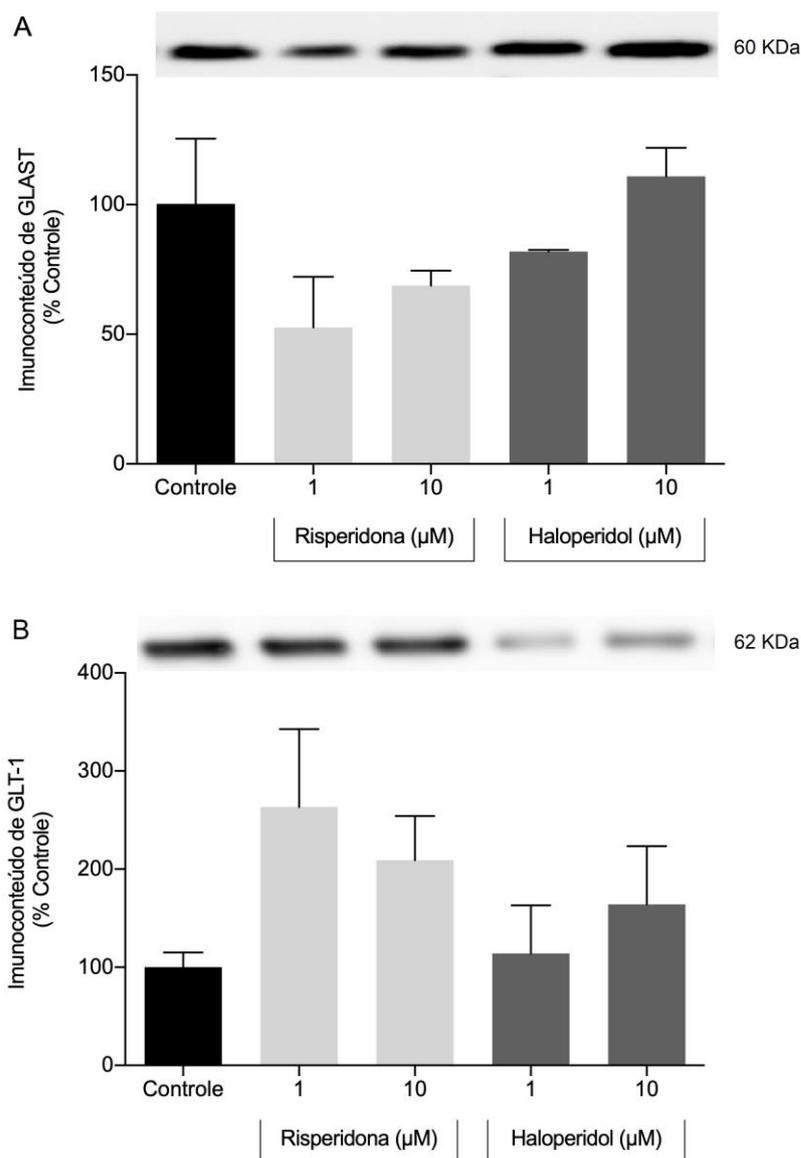


Figura 4: Efeitos da risperidona e do haloperidol sobre o imunoc conteúdo dos transportadores astrocitários GLAST (A) e GLT-1 (B). Os transportadores foram avaliados pelo método de *Western Blotting* em fatias hipocâmpais após tratamentos com risperidona e haloperidol nas concentrações de 1 e 10 μM por 1 h. Os dados são expressos como porcentagens em relação ao controle e representam a média \pm desvio padrão de seis determinações experimentais independentes. As diferenças entre os grupos foram analisadas estatisticamente usando ANOVA de uma via, seguido por um teste post-hoc de Tukey para comparações múltiplas.

A GS é uma enzima astrocitária diretamente associada ao ciclo glutamato-glutamina. Nossos resultados indicam que tanto a risperidona, quanto o haloperidol, em ambas concentrações testadas, não foram capazes de alterar a atividade da GS (Fig. 5).

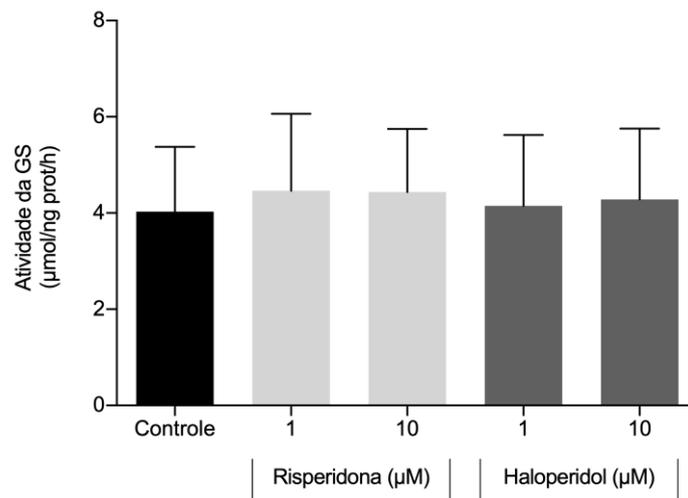


Figura 5: Efeitos da risperidona e do haloperidol sobre a atividade da GS. A atividade da enzima foi avaliada em homogeneizado de fatias hipocâmpais tratadas com risperidona e haloperidol nas concentrações de 1 e 10 µM por 1 h. Os dados são expressos como atividade em µmol/mg de proteína/h e representam a média ± desvio padrão de nove determinações experimentais independentes. As diferenças entre os grupos foram analisadas estatisticamente usando ANOVA de uma via, seguido por um teste post-hoc de Tukey para comparações múltiplas.

A GSH é uma importante defesa antioxidante para o SNC. Porém, não observamos alterações significativas no seu conteúdo intracelular em resposta ao tratamento com os antipsicóticos (Fig. 6).

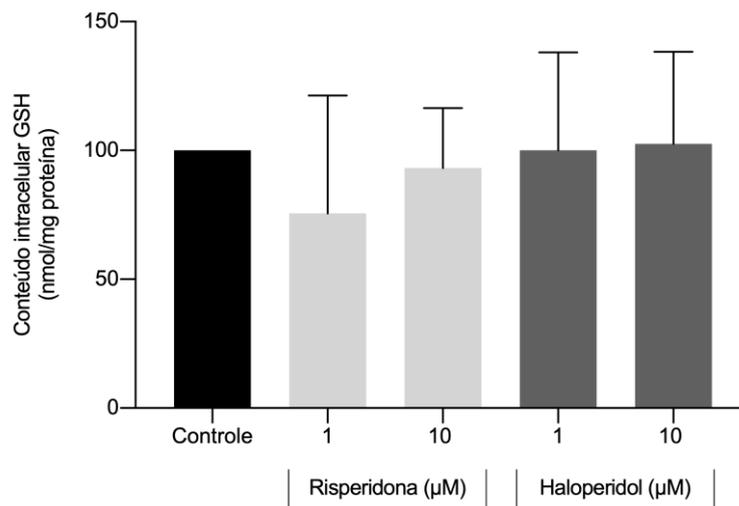


Figura 6: Efeitos da risperidona e do haloperidol sobre o conteúdo de GSH intracelular. O experimento foi realizado em homogeneizado de fatias hipocâmpais tratadas com risperidona e haloperidol nas concentrações de 1 e 10 µM por 1 h. Os dados são expressos em nmol/mg de proteína e representam a média ± desvio padrão de treze determinações experimentais independentes. As diferenças entre os grupos foram analisadas estatisticamente usando ANOVA de uma via, seguido por um teste post-hoc de Tukey para comparações múltiplas.

No meio extracelular, a GSH liberada pelos astrócitos fornece cisteína e glicina para a produção de GSH neuronal (AOYAMA; WATABE; NAKAKI, 2008). No entanto, não houve alteração significativa no conteúdo de GSH extracelular em nenhum dos grupos tratados, embora tenha sido observado uma tendência de aumento no tratamento com 10 μ M de risperidona e 1 μ M de haloperidol comparado às condições controle (Fig. 7).

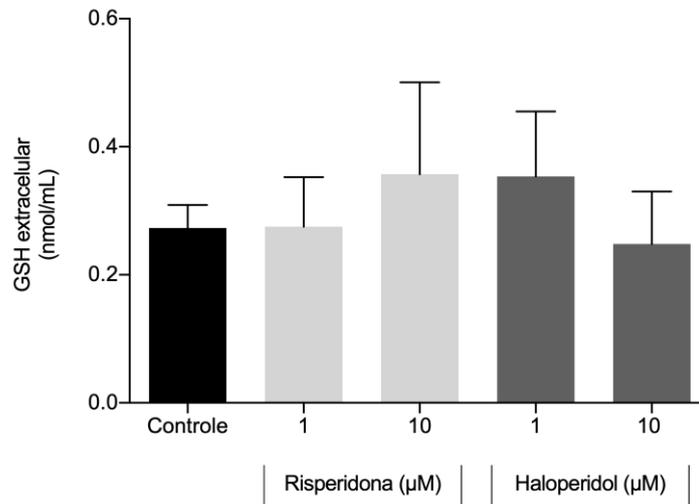


Figura 7: Efeitos da risperidona e do haloperidol sobre o conteúdo de GSH extracelular. O experimento foi realizado no meio extracelular de fatias hipocâmpais tratadas com risperidona e haloperidol nas concentrações de 1 e 10 μ M por 1 h. Os dados são expressos em nmol/mL e representam a média \pm padrão de oito determinações experimentais independentes. As diferenças entre os grupos foram analisadas estatisticamente usando ANOVA de uma via, seguido por um teste post-hoc de Tukey para comparações múltiplas.

5.3 Na⁺K⁺-ATPase

A Na⁺K⁺-ATPase é uma enzima fundamental para a homeostasia do SNC. Alterações na sua atividade podem estar associadas à possíveis danos celulares, no entanto, também não observamos nenhuma alteração significativa na atividade da Na⁺K⁺-ATPase após os tratamentos com os antipsicóticos (Fig. 8).

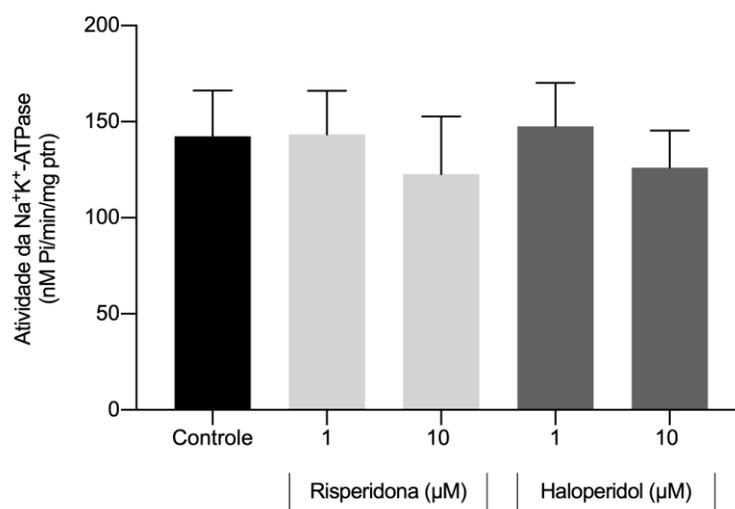


Figura 8: Efeitos da risperidona e do haloperidol sobre a atividade da enzima Na⁺K⁺-ATPase. O experimento foi realizado com homogeneizado de fatias hipocâmpais tratadas com risperidona e haloperidol nas concentrações de 1 e 10 μM por 1 h. Os dados são expressos como atividade em nM Pi/min/mg de proteína e representam a média ± desvio padrão de oito determinações experimentais independentes. As diferenças entre os grupos foram analisadas estatisticamente usando ANOVA de uma via, seguido por um teste post-hoc de Tukey para comparações múltiplas.

5.4 FATORES TRÓFICOS

A síntese e a liberação de fatores tróficos são essenciais para o desenvolvimento e sobrevivência das células neurais. Neste sentido, observamos uma diminuição significativa nos níveis de BDNF e GDNF após exposição à 10 μM de risperidona ($P < 0,0001$), bem como no tratamento com 1 μM e 10 μM de haloperidol ($P < 0,0001$) em relação às condições controle. Além disso, a diminuição dos níveis de GDNF causada pelo haloperidol foi dose-dependente. O tratamento com haloperidol induziu um aumento significativo de TGF-β na dose 10 μM ($P < 0,0001$) em relação ao controle, enquanto o inverso ocorreu no tratamento com 10 μM de risperidona ($P < 0,0001$). Observou-se uma diminuição, porém não significativa, de S100B no tratamento com risperidona (10 μM) comparado às condições controle (Fig. 9).

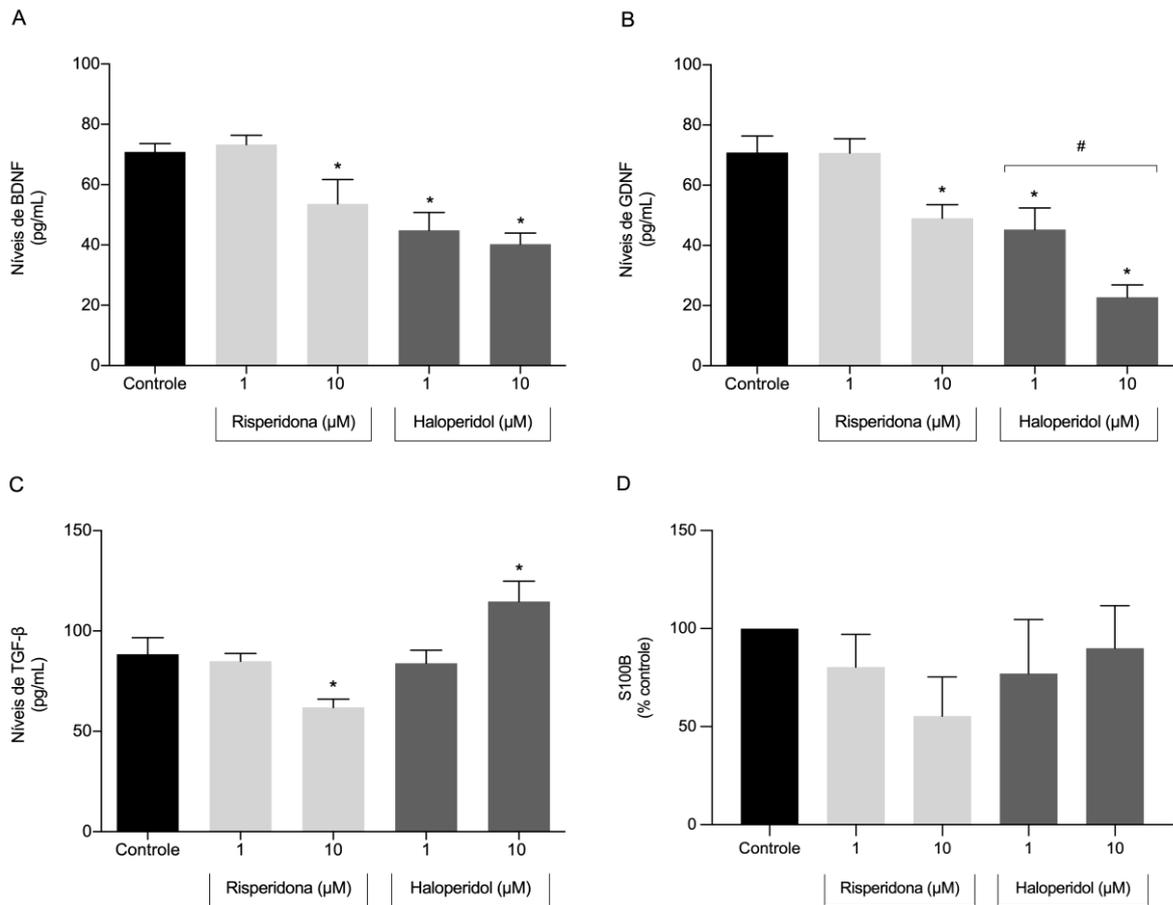


Figura 9: Efeitos da risperidona e do haloperidol sobre a liberação de fatores tróficos. As dosagens de BDNF (A), GDNF (B), TGF-β (C) e S100B (D) foram realizadas no meio extracelular de fatias hipocâmpais tratadas com risperidona e haloperidol nas concentrações de 1 e 10 μM por 1 h. Os dados são expressos em pg/mL para os gráficos A, B e C, representando a média ± desvio padrão de oito determinações experimentais independentes. Para o gráfico D, os resultados foram expressos como porcentagem em relação às condições controle e representam três determinações experimentais independentes. As diferenças entre os grupos foram analisadas estatisticamente usando ANOVA de uma via, seguido por um teste post-hoc de Tukey para comparações múltiplas. * indica diferença comparado às condições controle; # indica diferenças entre as doses ($P < 0,05$).

5.5 RESPOSTA INFLAMATÓRIA

IL-1β e TNF-α são citocinas que apresentam importantes efeitos pró-inflamatórios. Nas fatias (Fig. 10), houve uma diminuição significativa da liberação de IL-1β no tratamento com risperidona na dose de 10 μM ($P < 0,0001$) e um aumento no tratamento com haloperidol na dose 10 μM ($P < 0,0009$) comparados às condições controle. Quanto ao TNF-α, foi possível observar uma tendência de diminuição nos tratamentos com a risperidona em especial na dosagem de 1 μM. No tratamento com haloperidol é possível observar um leve aumento, embora não significativo. A IL-6 também pode apresentar efeitos pró-inflamatórios, no entanto, não observamos

alterações significativas em seus níveis após exposição aos antipsicóticos. Por outro lado, a IL-10 possui ação anti-inflamatória, e a risperidona na dose de 10 μM ($P < 0,0001$) induziu um aumento significativo na liberação desta citocina comparado às condições controle.

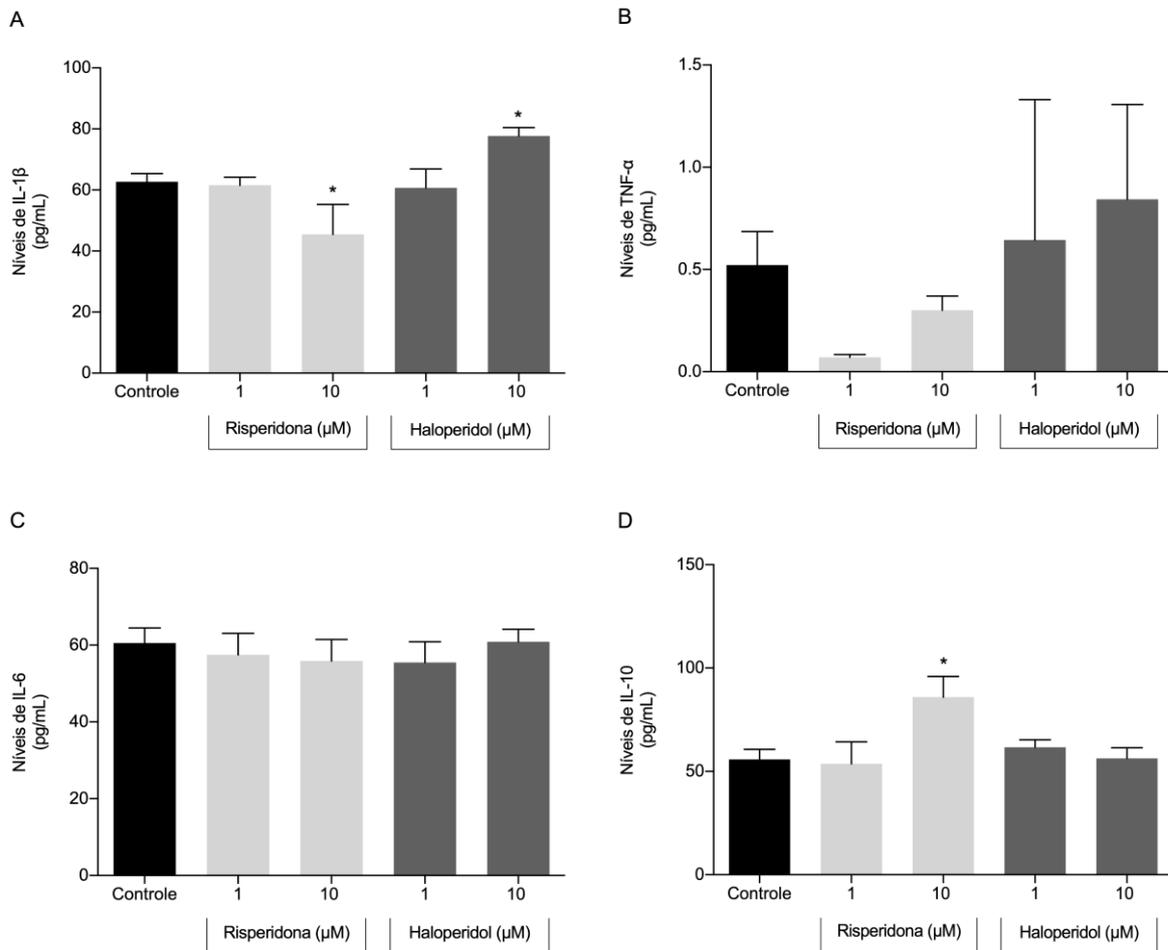


Figura 10: Efeitos da risperidona e do haloperidol sobre a resposta inflamatória. Os níveis de IL-1 β (A), TNF- α (B), IL-6 (C) e IL-10 (D) foram dosados no meio extracelular de fatias hipocâmpais tratadas com risperidona e haloperidol nas concentrações de 1 e 10 μM por 1 h. Os dados são expressos em pg/mL e representam a média \pm desvio padrão de oito determinações experimentais independentes. As diferenças entre os grupos foram analisadas estatisticamente usando ANOVA de uma via, seguido por um teste post-hoc de Tukey para comparações múltiplas. * indica diferença em relação às condições controle ($P < 0,05$).

A HMGB1 é uma alarmina que possui um papel importante na via de sinalização inflamatória (ANDERSSON; TRACEY, 2011). Não houve um efeito significativo nos níveis de RNAm de HMGB1 nos tratamentos realizados, mas foi possível observar uma tendência ao aumento na concentração de 10 μM de haloperidol (Fig. 11).

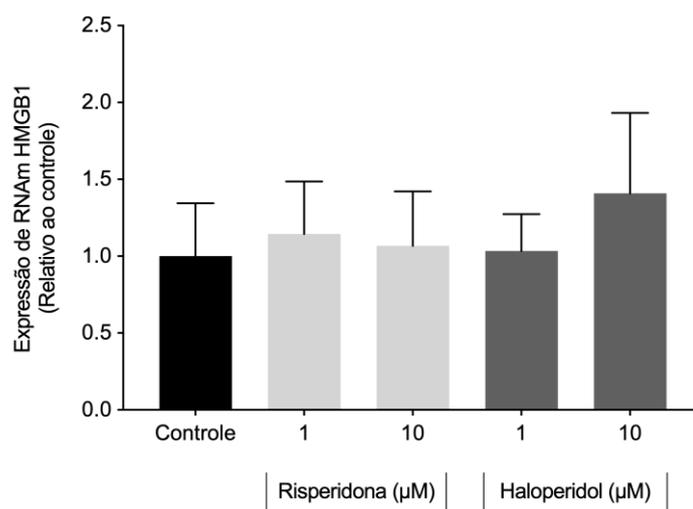


Figura 11: Efeitos da risperidona e do haloperidol sobre a expressão de HMGB1. A expressão de RNAm foi avaliada por RT-PCR em fatias hipocâmpais tratadas com risperidona e haloperidol nas concentrações de 1 e 10 μM por 1 h. Os dados foram padronizados em relação ao controle e representam a média \pm desvio padrão de sete determinações experimentais independentes. As diferenças entre os grupos foram analisadas estatisticamente usando ANOVA de uma via, seguido por um teste post-hoc de Tukey para comparações múltiplas.

5.6 MECANISMOS DE SINALIZAÇÃO CELULAR

A via de sinalização da PI3K participa da modulação do crescimento, migração, proliferação e metabolismo celular (POMPURA; DOMINGUEZ-VILLAR, 2018). Nenhum dos antipsicóticos testados neste projeto foi capaz de alterar o imunoconteúdo de fosfo-PI3K (Fig. 12).

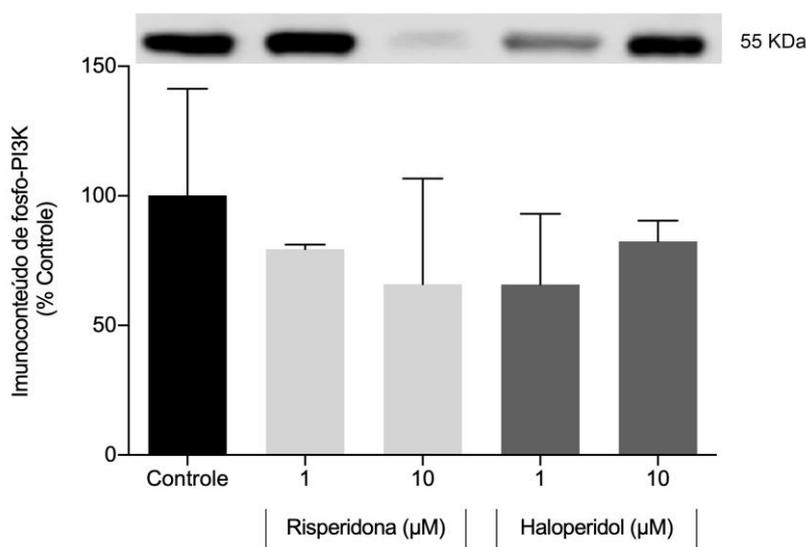


Figura 12: Efeitos da risperidona e do haloperidol sobre o imunoccontento de fosfo-PI3K. A proteína foi avaliada pelo método de *Western Blotting* em fatias hipocâmpais tratadas com risperidona e haloperidol

nas concentrações de 1 e 10 μM por 1 h. Os dados são expressos como porcentagens em relação às condições controle e representam a média \pm desvio padrão de seis determinações experimentais independentes. As diferenças entre os grupos foram analisadas estatisticamente usando ANOVA de uma via, seguido por um teste post-hoc de Tukey para comparações múltiplas.

A AMPK está associada a diversas funções celulares, incluindo a homeostase energética e, após o tratamento com haloperidol nas doses de 1 μM ($P = 0,0282$) e 10 μM ($P = 0,0373$), observamos um aumento significativo da expressão do RNAm da AMPK, comparada às condições controle (Fig. 13).

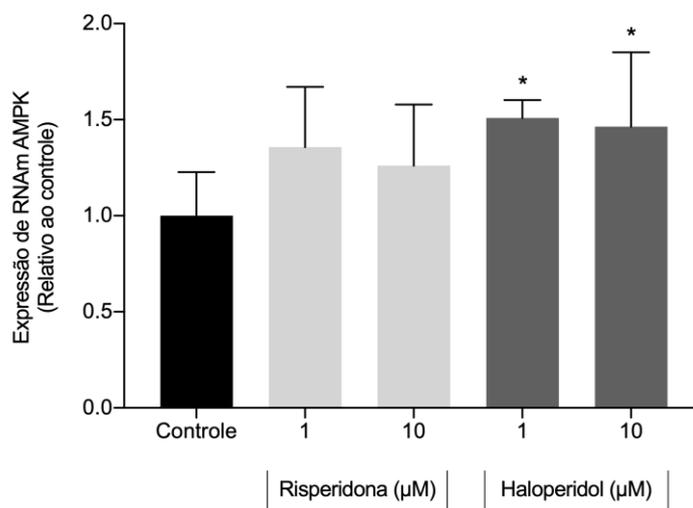


Figura 13: Efeitos da risperidona e do haloperidol sobre a expressão da AMPK. A expressão de RNAm foi avaliada por RT-PCR em fatias hipocâmpais tratadas com risperidona e haloperidol nas concentrações de 1 e 10 μM por 1 h. Os dados foram padronizados em relação ao controle e representam a média \pm desvio padrão de sete determinações experimentais independentes. As diferenças entre os grupos foram analisadas estatisticamente usando ANOVA de uma via, seguido por um teste post-hoc de Tukey para comparações múltiplas. * indica diferença das condições de controle ($P < 0,05$).

O Nrf2 está envolvido com a resposta celular a alterações oxidativas e inflamatórias, e a figura 14 mostra que o tratamento com haloperidol induziu um aumento significativo na expressão deste fator de transcrição na dose 10 μM ($P = 0,0387$), bem como na dose de 1 μM de risperidona ($P = 0,0202$).

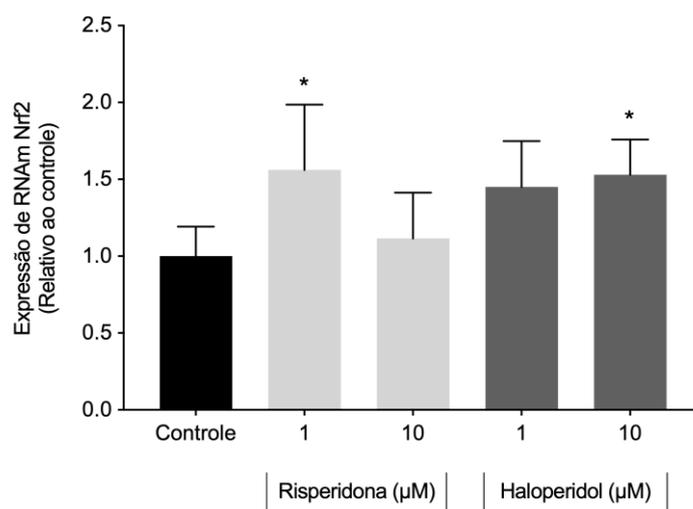


Figura 14: Efeitos da risperidona e do haloperidol sobre a expressão de Nrf2. A expressão de RNAm foi avaliada por RT-PCR em fatias hipocâmpais tratadas com risperidona e haloperidol nas concentrações de 1 e 10 µM por 1 h. Os dados foram padronizados em relação ao controle e representam a média ± desvio padrão de sete determinações experimentais independentes. As diferenças entre os grupos foram analisadas estatisticamente usando ANOVA de uma via, seguido por um teste post-hoc de Tukey para comparações múltiplas. * indica diferença comparada às condições controle ($P < 0,05$).

A heme oxigenase-1 (HO-1) é uma enzima ativada em situações de estresse celular, que também está envolvida no processo inflamatório e na defesa antioxidante, e nossos resultados mostraram um aumento significativo no RNAm da HO-1 no tratamento com haloperidol na doses 1 µM ($P = 0,0079$) e 10 µM ($P = 0,0401$) e no tratamento com risperidona na dose 1 µM ($P = 0,0262$) comparados às condições controle (Fig. 15).

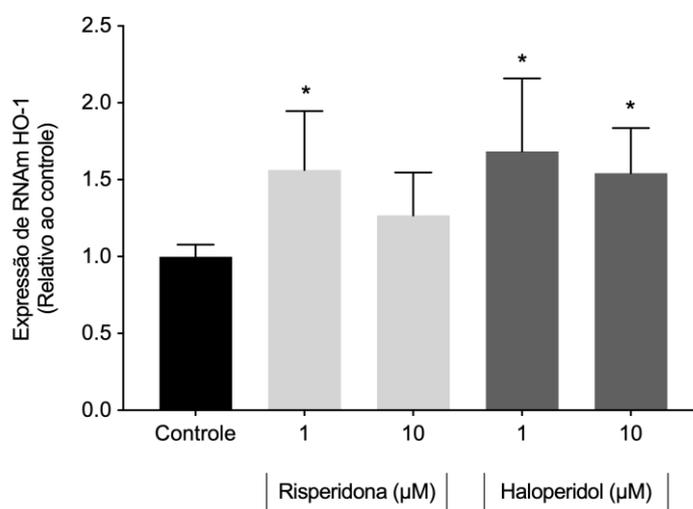


Figura 15: Efeitos da risperidona e do haloperidol sobre a expressão da HO-1. A expressão de RNAm foi avaliada por RT-PCR em fatias hipocâmpais tratadas com risperidona e haloperidol nas concentrações de 1 e 10 µM por 1 h. Os dados foram padronizados em relação ao controle e representam a média ± desvio padrão de sete determinações experimentais independentes. As

diferenças entre os grupos foram analisadas estatisticamente usando ANOVA de uma via, seguido por um teste post-hoc de Tukey para comparações múltiplas. * indica diferença comparadas às condições controle ($P < 0,05$).

O fator de transcrição NF- κ B também está envolvido na resposta celular em condições oxidativas e inflamatórias, bem como participa de processos de plasticidade sináptica e de memória (KARIN; DELHASE, 2000). Neste sentido, nossos resultados indicam ausência de alterações significativas na expressão da subunidade p50 do NF- κ B nas fatias submetidas à exposição aos antipsicóticos, embora haja um leve aumento (não significativo) com o tratamento com haloperidol. No entanto, para a subunidade p65 do NF- κ B, observamos um aumento significativo dose-dependente no tratamento com haloperidol 1 μ M e 10 μ M comparado às condições controle ($P < 0,0001$) (Fig. 16).

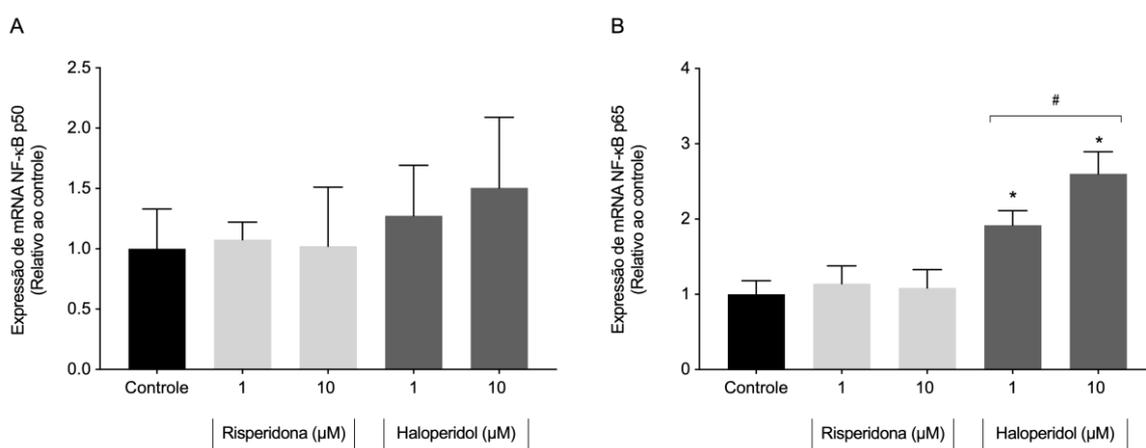


Figura 16: Efeitos da risperidona e do haloperidol sobre a expressão de NF- κ B p50 e NF- κ B p65. A expressão de RNAm foi avaliada por RT-PCR em fatias hipocâmpicas tratadas com risperidona e haloperidol nas concentrações de 1 e 10 μ M por 1 h. Os dados foram padronizados em relação ao controle e representam a média \pm desvio padrão de sete determinações experimentais independentes. As diferenças entre os grupos foram analisadas estatisticamente usando ANOVA de uma via, seguido por um teste post-hoc de Tukey para comparações múltiplas. * indica diferença comparada às condições controle; # indica diferenças entre as doses ($P < 0,05$).

Sabe-se que os receptores adenosinérgicos estão associados ao processo inflamatório, e neste sentido, o tratamento com haloperidol 1 μ M ($P < 0,0001$) e 10 μ M ($P < 0,0001$) aumentou significativamente e de maneira dose-dependente a expressão do receptor A2a comparado às condições controle, enquanto não se observaram alterações no tratamento com risperidona. Os receptores A1, A2b e A3 não apresentaram diferenças significativas comparadas às condições controle (Fig. 17).

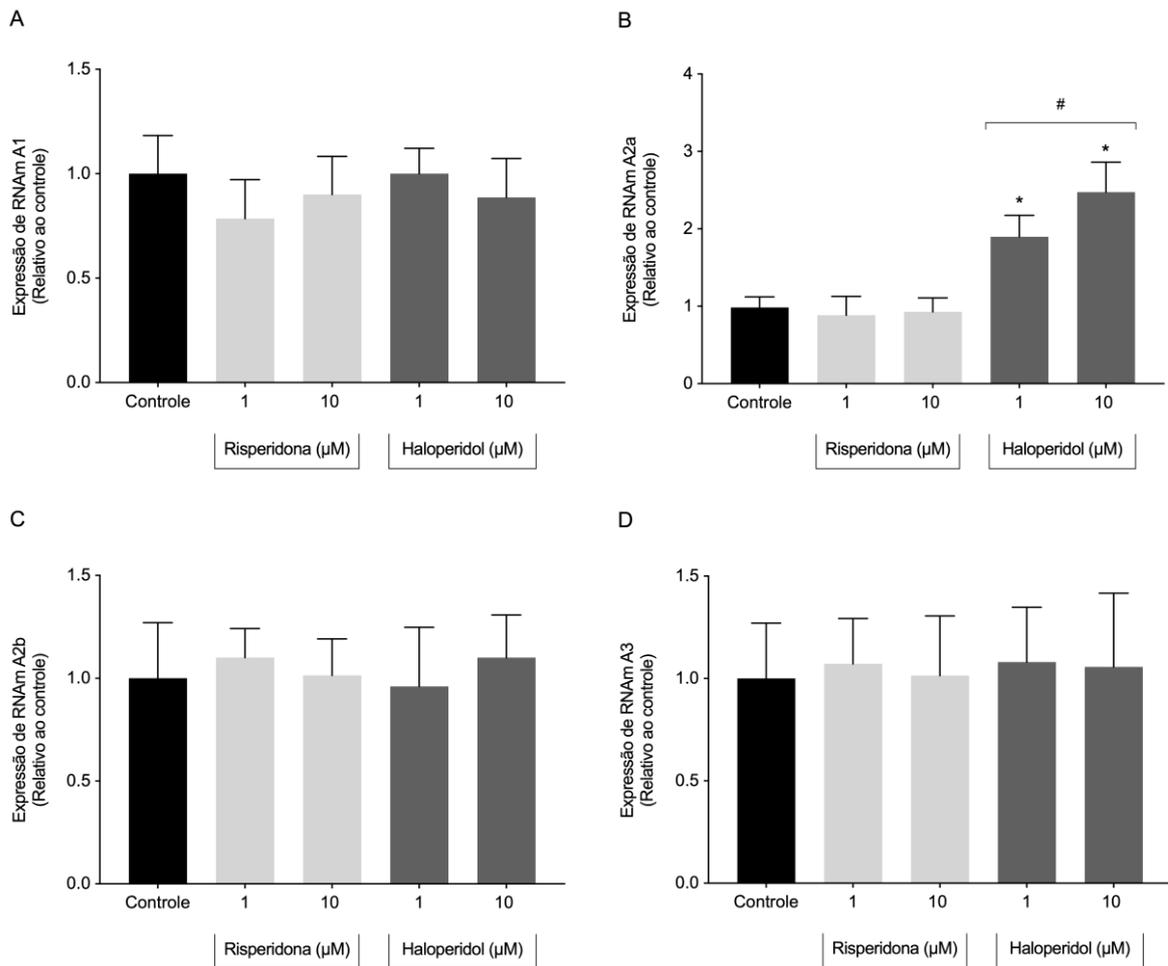


Figura 17: Efeitos da risperidona e do haloperidol sobre a expressão de receptores de adenosina A1 (A), A2a (B), A2b (C) e A3 (D). A expressão de RNAm foi avaliada por RT-PCR em fatias hipocâmpais tratadas com risperidona e haloperidol nas concentrações de 1 e 10 μM por 1 h. Os dados foram padronizados em relação ao controle e representam a média \pm desvio padrão de sete determinações experimentais independentes. As diferenças entre os grupos foram analisadas estatisticamente usando ANOVA de uma via, seguido por um teste post-hoc de Tukey para comparações múltiplas. * indica diferença das condições de controle; # indica diferenças entre as doses ($P < 0,05$).

A sinaptofisina é uma proteína transmembrana das vesículas sinápticas e nossos resultados indicam que após a exposição aos antipsicóticos não houve alterações significativas no seu imunoconteúdo, embora se observe uma tendência ao aumento no tratamento com 1 μM risperidona (Fig. 18).

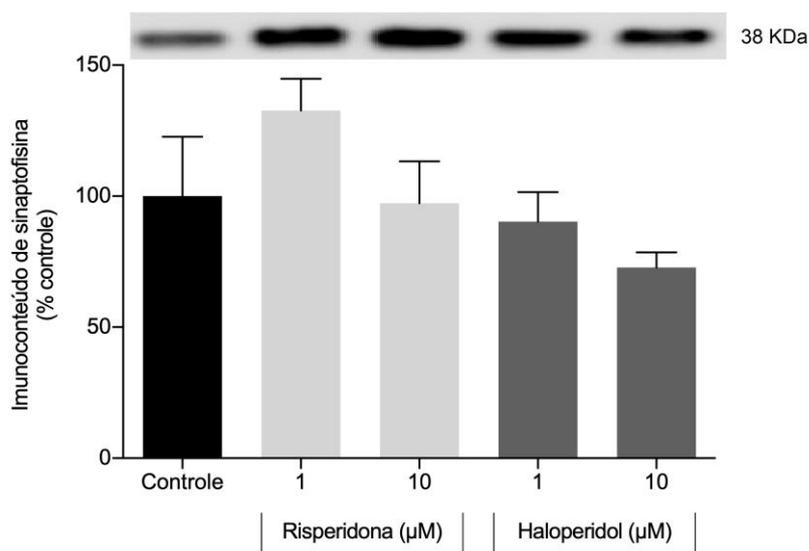


Figura 18: Efeitos da risperidona e do haloperidol sobre o imunoc conteúdo de sinaptofisina. A proteína foi avaliada pelo método de *Western Blotting* em fatias hipocâmpais tratadas com risperidona e haloperidol nas concentrações de 1 e 10 μM por 1 h. Os dados são expressos como porcentagens em relação às condições controle, e representam a média ± desvio padrão de seis determinações experimentais independentes. As diferenças entre os grupos foram analisadas estatisticamente usando ANOVA de uma via, seguido por um teste post-hoc de Tukey para comparações múltiplas.

5.7 ANÁLISES EM CULTURA PRIMÁRIA DE ASTRÓCITOS HIPOCÂMPAIS

Após avaliação dos efeitos dos antipsicóticos nas fatias hipocâmpais, investigou-se mais especificamente a resposta astrocitária frente ao tratamento com risperidona e haloperidol em cultura primária de astrócitos. Para isso, avaliamos parâmetros como viabilidade celular através das medidas de MTT e incorporação de iodeto de propídio (IP) (dados não mostrados), bem como metabolismo energético, pela avaliação dos níveis de lactato no meio extracelular. Ambos os parâmetros não apresentaram alterações após exposição ao haloperidol e à risperidona nas doses de 1 μM e 10 μM (as mesmas utilizadas no modelo experimental de fatias hipocâmpais agudas) por 24 h (Fig. 19).

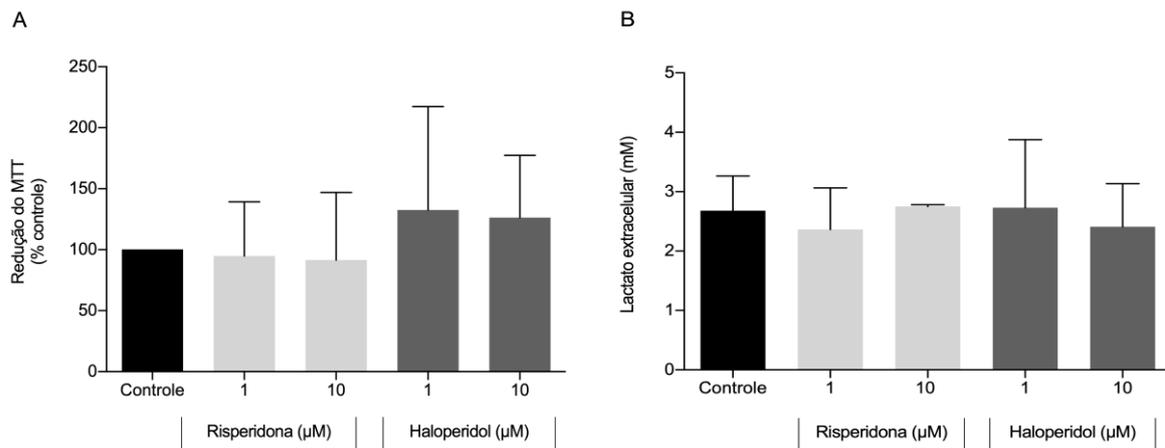


Figura 19: Efeitos da risperidona e do haloperidol na viabilidade celular e na liberação de lactato. (A) A atividade mitocondrial celular (medida pelo ensaio de redução do MTT) foi avaliada em cultura de astrócitos hipocâmpais após tratamentos com risperidona e haloperidol nas doses 1 e 10 μM por 24 h. (B) O lactato foi avaliado por kit comercial no meio extracelular de culturas de astrócitos hipocâmpais após tratamentos com risperidona e haloperidol nas concentrações de 1 e 10 μM por 24 h. Os dados são expressos como porcentagens em relação às condições controle para o ensaio de redução de MTT e em mM para os níveis de lactato, e representam a média \pm desvio padrão de cinco determinações experimentais independentes, realizadas em triplicata. As diferenças entre os grupos foram analisadas estatisticamente usando ANOVA de uma via, seguido por um teste post-hoc de Tukey para comparações múltiplas.

A atividade da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$ também foi avaliada nas culturas, e embora não tenha apresentado alteração, foi observada uma diminuição não significativa após a exposição a 10 μM de haloperidol (Fig. 20).

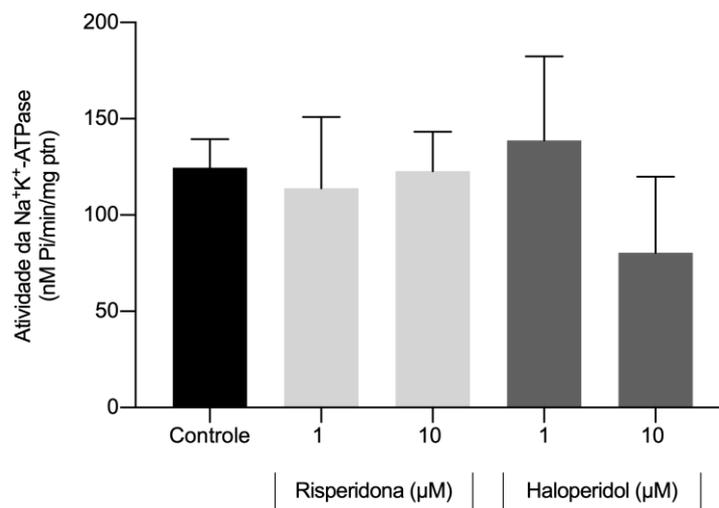


Figura 20: Efeitos da risperidona e do haloperidol sobre a atividade da enzima $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$. O experimento foi realizado com o lisado das culturas de astrócitos hipocâmpais tratadas com risperidona e haloperidol nas concentrações de 1 e 10 μM por 24 h. Os dados são expressos como atividade em nM Pi/min/mg de proteína, e representam a média \pm desvio padrão de cinco determinações experimentais independentes. As diferenças entre os grupos foram analisadas estatisticamente usando ANOVA de uma via, seguido por um teste post-hoc de Tukey para comparações múltiplas.

A secreção de fatores tróficos também foi avaliada, e observamos uma diminuição significativa nos níveis de BDNF no tratamento com risperidona 10 μM ($P < 0,0001$), bem como para o BDNF e o GDNF após exposição a 1 μM e 10 μM de haloperidol ($P < 0,0001$) comparado às condições controle. No entanto, os níveis de GDNF aumentaram significativamente no tratamento com risperidona 10 μM ($P < 0,0001$). Em relação aos níveis de TGF- β , observamos um aumento significativo apenas para o haloperidol, nas doses de 1 μM e 10 μM ($P < 0,0001$) (Fig. 21).

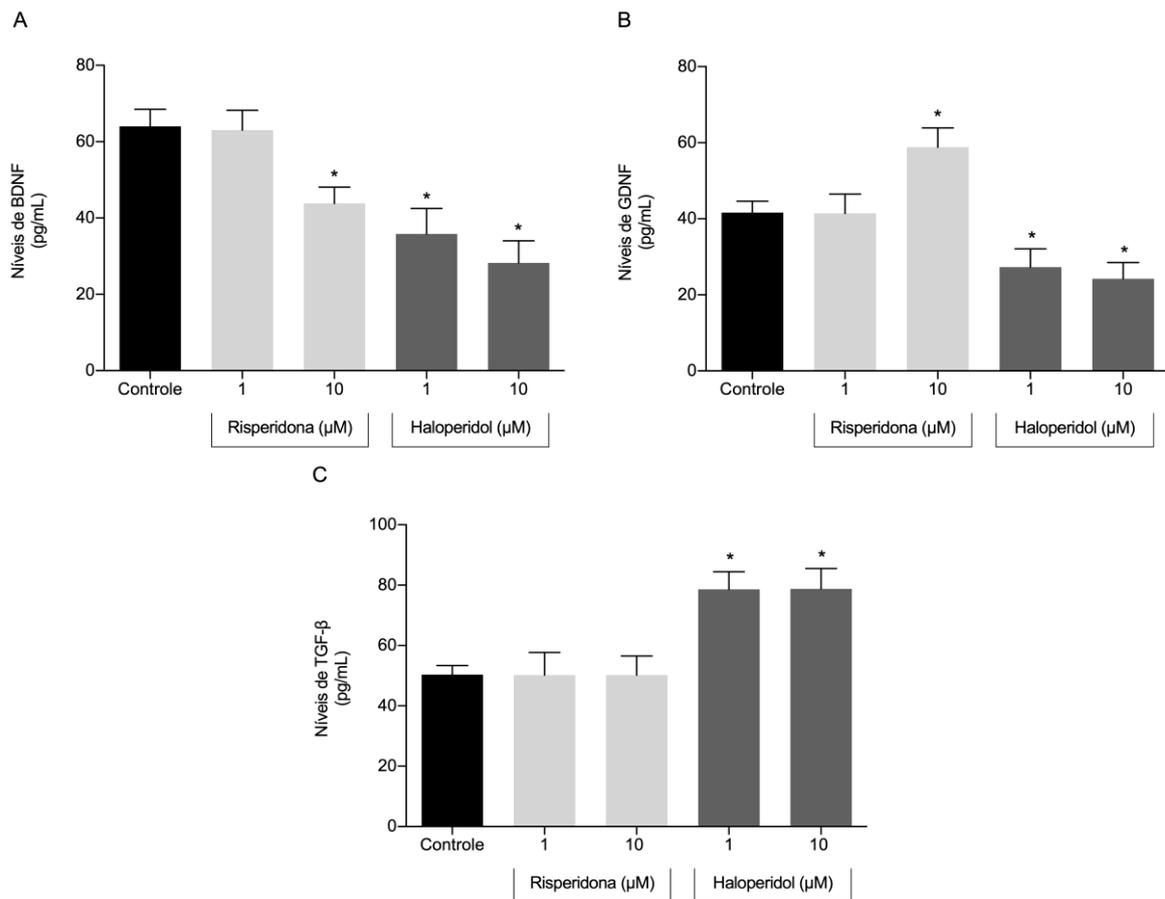


Figura 21: Efeitos da risperidona e do haloperidol sobre a secreção de fatores tróficos. As dosagens de BDNF (A), GDNF (B) e TGF- β (C) foram realizadas no meio extracelular de culturas de astrócitos hipocâmpais tratadas com risperidona e haloperidol nas concentrações de 1 e 10 μM por 24 h. Os dados são expressos como pg/mL e representam a média \pm desvio padrão de cinco determinações experimentais independentes. As diferenças entre os grupos foram analisadas estatisticamente usando ANOVA de uma via, seguido por um teste post-hoc de Tukey para comparações múltiplas. * indica diferença das condições de controle ($P < 0,05$).

Em relação aos parâmetros inflamatórios, foram analisadas a secreção das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β e IL-6, e observamos que a IL-1 β manteve o mesmo perfil observado nas fatias, com diminuição dos níveis após exposição à 10

μM ($P < 0,0001$) de risperidona e aumento da liberação de IL-1 β com 10 μM ($P < 0,0001$) de haloperidol (Fig. 23). No entanto, os níveis de TNF- α não foram alterados. Para a IL-6, observamos um aumento significativo no tratamento com haloperidol 10 μM ($P < 0,0001$) em relação ao controle (Fig. 19). Quando avaliado o efeito anti-inflamatório através da liberação da IL-10, foi observado um aumento significativo dose-dependente no tratamento com risperidona 1 μM e 10 μM ($P < 0,0001$) e um perfil inverso após exposição ao haloperidol, com redução significativa com a concentração de 10 μM ($P < 0,0001$).

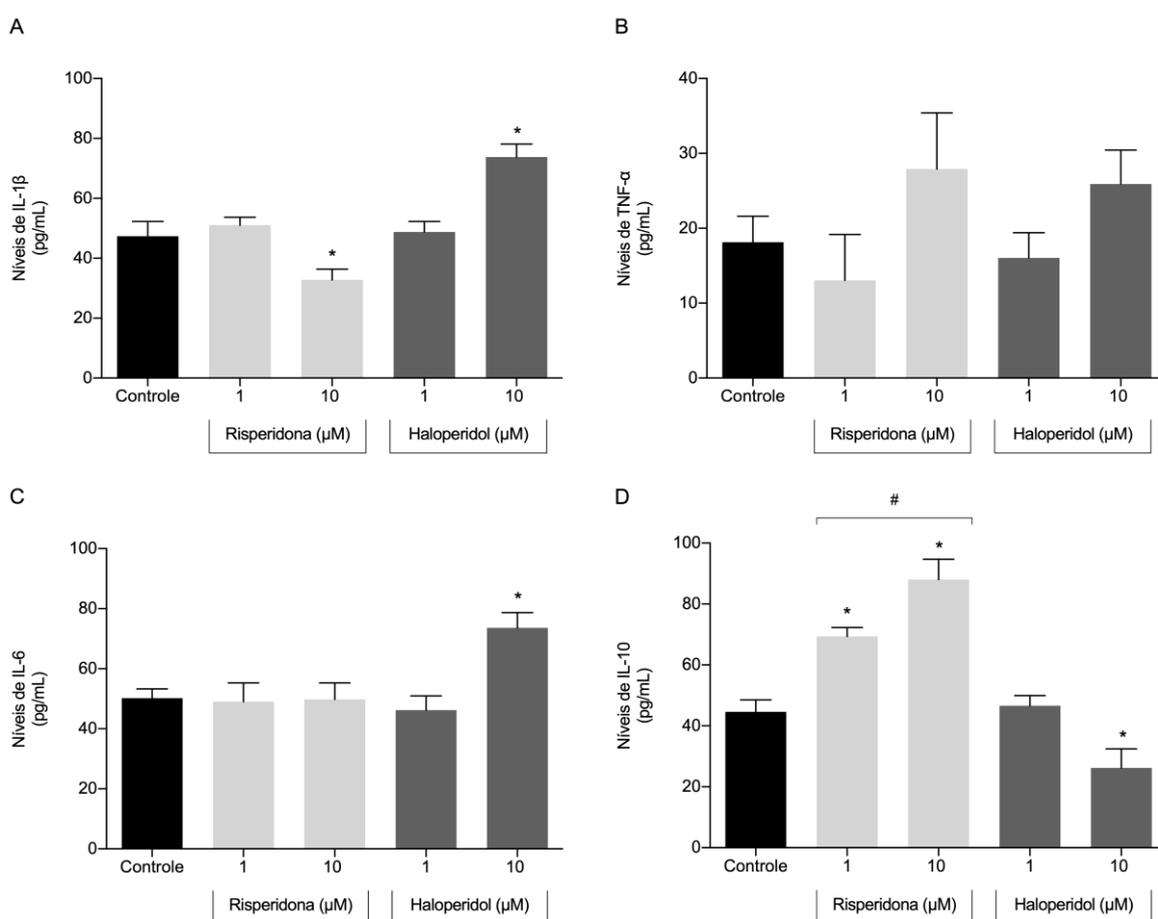


Figura 22: Efeitos da risperidona e do haloperidol sobre a resposta inflamatória. Os níveis de IL-1 β (A), TNF- α (B), IL-6 (C) e IL-10 (D) foram dosados no meio extracelular de culturas de astrócitos hipocâmpais tratadas com risperidona e haloperidol nas concentrações de 1 e 10 μM por 24 h. Os dados são expressos em pg/mL e representam a média \pm desvio padrão de cinco determinações experimentais independentes. As diferenças entre os grupos foram analisadas estatisticamente usando ANOVA de uma via, seguido por um teste post-hoc de Tukey para comparações múltiplas. * indica diferença das condições de controle; # indica diferenças entre as doses ($P < 0,05$).

5.8 RESUMO DOS RESULTADOS

Tabela 1: Resumo dos resultados em fatias hipocâmpais e em cultura de células.

Grupo	Parâmetro	Fatias agudas		Cultura de astrócitos		Metodologia
		Risperidona	Haloperidol	Risperidona	Haloperidol	
Viabilidade/ Metabolismo da Glicose	MTT (%)	-	-	-	-	Colorimétrica
	IP (%)	NT	NT	-	-	Microscopia
	Glicose extracelular (mmol/L)	-	↓	NT	NT	Colorimétrica
	Lactato (mM)	-	↑	-	-	Colorimétrica
Metabolismo do Glutamato	GLAST (%)	*	-	NT	NT	WB
	GLT-1 (%)	-	-	NT	NT	WB
	GS (μmol/mg prot/h)	-	-	NT	NT	Colorimétrica
	GSH intracelular (nmol/mg prot)	-	-	NT	NT	Fluorimétrica
	GSH extracelular (nmol/mL)	*	*	NT	NT	Fluorimétrica
Na ⁺ K ⁻ - ATPase	Atividade da Na ⁺ K ⁻ -ATPase (nM Pi/min/mg ptn)	-	-	-	*	Enzimática
Fatores Tróficos	BDNF (pg/mL)	↓	↓	↓	↓	ELISA
	GDNF (pg/mL)	↓	↓	↑	↓	ELISA
	TGF-β (pg/mL)	↓	↑	-	↑	ELISA
	S100B (%)	*	-	NT	NT	ELISA
Resposta Inflamatória	IL-1β (pg/mL)	↓	↑	↓	↑	ELISA
	TNF-α (pg/mL)	*	*	-	-	ELISA
	IL-6 (pg/mL)	-	-	-	↑	ELISA
	IL-10 (pg/mL)	↑	-	↑	↓	ELISA
	HMGB1 (RNAm)	-	*	NT	NT	RT-PCR
Mecanismos de Sinalização Celular	Fosfo-PI3K (%)	-	-	NT	NT	WB
	AMPK (RNAm)	-	↑	NT	NT	RT-PCR
	Nrf2 (RNAm)	↑	↑	NT	NT	RT-PCR
	HO-1 (RNAm)	↑	↑	NT	NT	RT-PCR
	NF-κB p50 (RNAm)	-	*	NT	NT	RT-PCR
	NF-κB p65 (RNAm)	-	↑	NT	NT	RT-PCR
	A1 (RNAm)	-	-	NT	NT	RT-PCR
	A2a (RNAm)	-	↑	NT	NT	RT-PCR
	A2b (RNAm)	-	-	NT	NT	RT-PCR
	A3 (RNAm)	-	-	NT	NT	RT-PCR
Sinaptofisina (%)	*	-	NT	NT	WB	

Resumo dos resultados obtidos a partir das análises realizadas em fatias agudas hipocâmpais e em culturas de astrócitos de hipocampo. Legenda: NT Parâmetro Não Testado para o modelo; – sem alteração; ↑ aumento significativo; ↓ diminuição significativa; * indicativo de tendência (resultado não significativo); WB: *western blotting*.

6 DISCUSSÃO

Neste tópico serão discutidos os resultados das análises realizadas com as fatias agudas de hipocampo a partir da literatura existente. Os dados obtidos nas análises realizadas com as culturas de astrócitos servirão para melhorar a compreensão dos antipsicóticos sobre parâmetros astrocitários no hipocampo adulto, a fim de elucidar possíveis ações destes medicamentos no SNC.

Quanto à viabilidade celular, os antipsicóticos não induziram alterações tanto nas fatias quanto nas culturas de astrócitos de hipocampo. Estes resultados podem estar relacionados às dosagens testadas. As dosagens escolhidas para a realização deste trabalho, desde os experimentos iniciais contemplando 5 doses diferentes até a definição de 2 doses principais para os demais experimentos, partem do pressuposto de que os fármacos testados influenciam o ambiente celular sem causar morte ou dano celular exacerbado, como observado inclusive em estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa (BOBERMIN et al., 2018; QUINCOZES-SANTOS et al., 2009, 2010). Além disso, em um estudo associando haloperidol e lítio em doses terapêuticas não foram observadas alterações na viabilidade da linhagem de neuroblastoma SH-SY5Y (GAWLIK-KOTELNICKA et al., 2016). Dessa forma, como não houve alteração na viabilidade celular, as maiores doses testadas foram utilizadas para as demais investigações neuroquímicas e moleculares.

Antipsicóticos estão associados a alterações no metabolismo da glicose e também a um aumento no risco de obesidade e diabetes em pacientes que fazem administração crônica destes fármacos (JASSIM et al., 2012; SONG et al., 2014). Neste sentido, foi observada uma diminuição da glicose extracelular e um aumento significativo de lactato no tratamento com haloperidol. Uma diminuição da glicose no meio extracelular, associada a um aumento de lactato, pode estar relacionada a um maior consumo de glicose através da via glicolítica pelas células neurais, indicando possíveis alterações no metabolismo energético (DIENEL, 2013). Além disso, observamos um aumento do RNAm da AMPK no tratamento com haloperidol. A AMPK é um sensor de energia celular e estado de nutrientes que monitora a proporção de AMP:ATP. Quando há um déficit de energia, atua para restaurar a homeostase energética, ativando as vias catabólicas alternativas que produzem ATP, inativando as vias biossintéticas e outros processos não essenciais que consomem ATP (HARDIE, 2014). Esses resultados indicam um possível efeito no metabolismo

energético do SNC e sobre as vias que controlam o consumo de energia por parte do haloperidol, que pode estar associado a uma compensação metabólica.

Os astrócitos também armazenam glicogênio como fonte de energia própria e para suporte de outros tipos celulares. Quando há um alto consumo de energia através da oxidação da glicose outras formas deste substrato podem ser requeridas a fim de obter o ATP necessário para manter a funcionalidade neural. Assim, a glicogenólise no astrócito produz lactato, que será utilizado para produção de energia pelos neurônios (PINACHO et al., 2016). Esse mecanismo também pode explicar o aumento do lactato no tratamento com haloperidol nas fatias de hipocampo de duas formas. A liberação de lactato a partir da quebra do glicogênio pela alta demanda de glicose pode estar relacionada à manutenção energética astrocitária (DIENEL, 2018), bem como para apoiar a taxa de respiração celular causada pela hipóxia no processo de obtenção de fatias agudas, e dessa forma, substituir a glicose para a manutenção da atividade sináptica neuronal (PELLERIN, 2003).

No entanto, o lactato possui funções além do metabolismo energético atuando como molécula de sinalização para diversos mecanismos celulares. Sua ligação ao receptor GPR81 no hipocampo, neocórtex e cerebelo está associada ao controle do fluxo sanguíneo e função sináptica, indicando um papel do lactato como mensageiro intercelular. Também pode ativar a expressão de proteínas que promovem a angiogênese e o crescimento celular assim, promovendo plasticidade (BERGERSEN, 2014; PROIA et al., 2016). Estudos sugerem também que o lactato promove a sobrevivência celular contra o estresse oxidativo por meio da indução de vias homeostáticas que incluem PI3K e mTOR (TAUFFENBERGER et al., 2019). Portanto, um aumento de lactato pode ser decorrente tanto de uma sinalização no metabolismo energético como de uma comunicação associada ao reparo de tecido e função celular. Dessa forma, a maior liberação de lactato em resposta ao tratamento com haloperidol pode sinalizar uma compensação de possíveis danos celulares causados por este fármaco, enquanto a risperidona não induziu tais alterações metabólicas, possivelmente por não causar danos que induzam a liberação de lactato.

A via de sinalização da PI3K também está envolvida em processos celulares relacionados ao controle do metabolismo, além de regular o crescimento, proliferação, sobrevivência e migração celular. Quando ativada, leva à fosforilação da Akt e consequente ativação da mTOR, que é essencial para o desenvolvimento neuronal e

a formação de sinapses (SÁNCHEZ-ALEGRÍA et al., 2018). No entanto, os tratamentos com os antipsicóticos em fatias não foram capazes de alterar significativamente a fosforilação da PI3K no tempo avaliado (1 h).

Nossos experimentos demonstraram que doses terapêuticas de antipsicóticos não alteraram o metabolismo do glutamato. Esse neurotransmissor é transportado para dentro dos astrócitos por transportadores específicos, onde posteriormente será convertido em outras moléculas que participarão de diferentes mecanismos celulares. Os transportadores de glutamato controlam a concentração de glutamato na fenda sináptica a fim de evitar seu acúmulo, que pode levar à excitotoxicidade glutamatérgica e consequente morte celular, desempenhando, portanto, um papel na preservação das funções sinápticas.

O GLT-1 é o principal transportador de glutamato do SNC altamente expresso em membranas gliais (RIMMELE; ROSENBERG, 2016). A tendência ao aumento da expressão deste transportador observado no tratamento com risperidona 1 e 10 μM nas fatias pode indicar a participação deste fármaco na regulação da homeostase glutamatérgica, particularmente pelos astrócitos. O transportador de glutamato GLAST também regula os níveis extracelulares de glutamato. No entanto, nossos resultados mostram que houve uma tendência a diminuição no imunoconteúdo de GLAST no tratamento com risperidona, o que poderia implicar em um aumento de glutamato na fenda sináptica (KARLSSON; HEILIG; HOLMES, 2008). Estes resultados sugerem um possível mecanismo compensatório entre os transportadores causado pela risperidona, para evitar o acúmulo de glutamato e consequente excitotoxicidade.

O glutamato intracelular pode seguir diferentes destinos metabólicos, como a conversão em glutamina. Neste sentido, a GS é uma enzima expressa em astrócitos no SNC, que catalisa a síntese de glutamina a partir da transferência de grupo amino para o glutamato (LEKE; SCHOUSBOE, 2016). Diretamente associada ao transporte glutamatérgico e ao ciclo glutamato-glutamina, a glutamina pode então atuar como precursora dos neurotransmissores glutamato e GABA (BOLAÑOS, 2016). No entanto, não houve alteração na atividade da GS, portanto, em nosso modelo experimental, os antipsicóticos parecem não interferir nas ações desta enzima.

Outro destino do glutamato pode ser a biossíntese de GSH. A GSH participa dos processos de defesa antioxidante astrocitária, atuando também na redução de

peróxidos (DRINGEN et al., 2015). A GSH tem um papel importante na regulação do estresse oxidativo e sua redução é catalisada pela GSH redutase, que usa o NADPH como cofator para regenerar a GSH (DIENEL, 2018). Além disso, a GSH extracelular proveniente dos astrócitos também pode proteger os neurônios contra o estresse oxidativo e a neurodegeneração (BOLAÑOS, 2016). Estudos anteriores do nosso grupo demonstraram um aumento de GSH pela risperidona em cultura de células C6 (BOBERMIN et al., 2018; QUINCOZES-SANTOS et al., 2009a, 2010a), no entanto, não houve alteração no conteúdo de GSH intra ou extracelular nos tratamentos testados em fatias hipocâmpais, indicando que as concentrações utilizadas de antipsicóticos não foram capazes de alterar o metabolismo da GSH em um tratamento agudo.

A sinaptofisina é uma proteína utilizada como marcador de atividade pré-sináptica que participa do processo de sinaptogênese. O aumento da expressão desta proteína está associado à quantidade de vesículas sinápticas que liberam neurotransmissores (SEO et al., 2015). Assim, esta proteína tem grande influência sobre a regulação e liberação de neurotransmissores ou densidade terminal pré-sináptica e, portanto, está relacionada à plasticidade. O efeito de fármacos antipsicóticos em proteínas sinápticas é variável entre os estudos e pode sofrer influências da metodologia experimental utilizada. Estudos mostraram que o haloperidol não desencadeou efeitos sobre os níveis destas proteínas no córtex e no hipocampo, sendo que o hipocampo já apresenta quantidade reduzida fisiologicamente (EASTWOOD; CAIRNS; HARRISON, 2000; EGBUJO; SINCLAIR; HAHN, 2016). Na avaliação realizada neste trabalho, não houve alteração no tratamento com haloperidol, no entanto, foi observado um aumento não significativo no tratamento com risperidona. Um aumento na expressão desta proteína por medicações antipsicóticas em condições como esquizofrenia pode ser benéfico para a manutenção das sinapses, visto que estes transtornos neuropsiquiátricos apresentam alterações sinápticas (BARR et al., 2006; EGBUJO; SINCLAIR; HAHN, 2016; OZDEMIR et al., 2012). Portanto, em condições fisiológicas, é provável que estes fármacos não alterem significativamente o conteúdo de sinaptofisina, no entanto, o tempo de tratamento de 1 hora também pode ter influenciado estes resultados.

Apesar de não ter apresentado alteração significativa no tratamento em fatias, o tratamento com haloperidol em culturas de astrócitos demonstrou uma tendência à diminuição da atividade da enzima Na⁺K⁺-ATPase. Além de bombear íons através da membrana celular, a Na⁺K⁺-ATPase está envolvida na organização de múltiplos complexos de proteínas na membrana plasmática, como por exemplo, a transdução de sinal (CUI; XIE, 2017). Sabe-se que o aumento de estresse oxidativo e nitrosativo pode causar modificação oxidativa nas subunidades da Na⁺K⁺-ATPase, podendo inibir sua atividade enzimática através do bloqueio do sítio de ligação da ouabaína (LIU; LILLY; SHAPIRO, 2018). Isso pode indicar um possível papel oxidativo do haloperidol, que já foi observada em outros estudos (QUINCOZES-SANTOS et al., 2010).

Os antipsicóticos são capazes de modular a secreção de fatores tróficos. O BDNF é uma neurotrofina sintetizada também em astrócitos, que atua modulando a transmissão e a plasticidade sináptica (CARVALHO et al., 2008). No hipocampo, ele atua na liberação de neurotransmissores, receptores pós-sinápticos de glutamato e síntese proteica, assim como o GDNF, uma neurotrofina derivada da glia, que atua na formação de sinapses (LEAL; BRAMHAM; DUARTE, 2017; LEDDA et al., 2007). Estudos anteriores demonstraram resultados diferentes sobre a expressão de BDNF, podendo apresentar-se aumentada ou diminuída no hipocampo. Esses efeitos podem estar associados aos tipos e a forma de tratamento com antipsicóticos (AUTRY; MONTEGGIA, 2012). Alguns estudos relacionam um perfil misto ou até inverso de atuação dos antipsicóticos atípicos, onde estes aumentam a expressão de BDNF e GDNF, podendo estar associados a uma melhora na neurogênese (FAVALLI et al., 2012; KUSUMI; BOKU; TAKAHASHI, 2015).

Neste trabalho, observamos uma redução da liberação de BDNF e GDNF nos tratamentos com haloperidol e risperidona nas fatias hipocâmpais, que pode estar relacionada a uma diminuição da neuroproteção e plasticidade celular (NANDRA; AGIUS, 2012). Como a expressão de GDNF nos astrócitos é induzida por neurônios dopaminérgicos, a diminuição observada nas fatias pode estar associada com os efeitos dos antipsicóticos sobre esse sistema neurotransmissor (YE et al., 2018). Alterações particularmente em células gliais podem resultar em diminuição do suporte trófico por estes fatores neurotróficos. Em culturas de astrócitos, também observamos uma diminuição da liberação de BDNF em resposta ao haloperidol e à risperidona. Em relação ao GDNF, observamos efeitos opostos: o haloperidol manteve a redução

observada nas fatias, enquanto a risperidona aumentou a liberação de GDNF. Um aumento de GDNF também foi observado em culturas de células de glioma C6 tratadas com antipsicóticos (SHAO et al., 2006), o que pode estar associado a um efeito neuroprotetor destes fármacos, particularmente da risperidona, mediado pelos astrócitos.

O GDNF está diretamente associado ao TGF- β , o qual está envolvido na inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias e na sobrevivência celular através do seu papel neurotrófico, podendo estar associado aos efeitos terapêuticos dos antipsicóticos (LEE; KIM, 2010). A elevação do TGF- β em tecido saudável pode indicar a ocorrência de um estado inflamatório e o haloperidol apresentou um aumento significativo na maior dose, o que poderia reforçar seu potencial papel pró-inflamatório. No entanto, em células microgliais, o haloperidol aumentou a expressão de TGF- β e BDNF e foi considerado benéfico para o tratamento de transtornos neuropsiquiátricos, uma vez que esse aumento parece estar relacionado a um processo de reparação de dano desencadeado pelo fármaco (NAMJOO et al., 2020). Por outro lado, nossos resultados indicam que o tratamento com a risperidona diminuiu os níveis de TGF- β . Em estudos clínicos, alguns antipsicóticos estão associados a redução dos níveis plasmáticos de TGF- β e citocinas pró-inflamatórias, também apresentando um perfil protetor (LI et al., 2015; MOMTAZMANESH; ZARE-SHAHABADI; REZAEI, 2019).

Em estudos anteriores do nosso grupo sobre a influência dos antipsicóticos na secreção de S100B, a risperidona induziu um aumento em células astrogliais C6 (NARDIN et al., 2011; QUINCOZES-SANTOS et al., 2008), mas não em fatias hipocâmpais (NARDIN et al., 2011). Neste estudo, a proteína S100B demonstrou uma diminuição, porém não significativa, com risperidona em fatias hipocâmpais. A S100B parece ser modulada e capaz de modular a secreção de moléculas inflamatórias (EDWARDS; ROBINSON, 2006; SCHMITT et al., 2007). Alguns estudos demonstraram uma correlação significativa entre S100B e citocinas pró-inflamatórias em distúrbios neurológicos e psiquiátricos (ASHRAF et al., 1999; STEINER et al., 2010), onde a secreção de S100B aumentada estava associada à reatividade astrocitária (MÜLLER; MYINT; SCHWARZ, 2009). Estes estudos sugerem que a S100B pode estar associada a mecanismos apoptóticos ou em processo reparatório nas situações degenerativas causadas por neuroinflamação (STEINER et al., 2013).

Os antipsicóticos podem modular respostas inflamatórias através da liberação de citocinas pró e anti-inflamatórias. Observamos em fatias hipocâmpais a diminuição de IL-1 β com risperidona e o aumento da mesma citocina com haloperidol. Além disso, a risperidona induziu um aumento de IL-10, sugerindo um papel anti-inflamatório da risperidona e pró-inflamatório do haloperidol, já observado anteriormente em células C6 (BOBERMIN et al., 2018). Em culturas de astrócitos de animais adultos, um perfil semelhante foi observado em relação a IL-1 β , IL-6 e IL-10, indicando alguma resposta compensatória por parte da risperidona no SNC, com participação direta dos astrócitos.

O tratamento com antipsicóticos atípicos parece apresentar respostas de perfil inflamatório contraditórias em diversos estudos. Estes achados podem estar relacionados aos modelos experimentais adotados, bem como, os tipos celulares e materiais de análise. Por exemplo, alguns estudos demonstraram níveis aumentados de TNF- α no soro de pacientes em tratamento crônico com antipsicóticos atípicos (MOMTAZMANESH; ZARE-SHAHABADI; REZAEI, 2019). Já em linhagem monocítica celular humana, o tratamento com antipsicóticos atípicos reduziu os níveis de citocinas pró-inflamatórias e o mesmo foi observado no tratamento de pacientes, onde níveis séricos de TNF- α , IL-1 β e IL-6 apresentaram-se significativamente mais elevados antes do tratamento, mostrando uma diminuição da resposta inflamatória após a administração dos fármacos (AZIZI et al., 2019; STAPEL et al., 2018). No entanto, em outro estudo, níveis elevados de proteína C reativa foram encontrados em pacientes que utilizaram altas concentrações de clozapina e risperidona (HEFNER et al., 2016).

Além disso, culturas de macrófagos tratadas com haloperidol e risperidona também apresentaram maiores concentrações de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, TNF α) e baixos níveis de citocinas anti-inflamatórias, o que sugere uma exacerbação dos processos inflamatórios nos tecidos periféricos e explicaria os efeitos sobre o metabolismo de lipídeos e os processos de ganho de peso do tratamento com estes fármacos (DA CRUZ JUNG et al., 2016). Ademais, os antipsicóticos parecem demonstrar uma resposta inflamatória relevante em situações onde já existe um processo inflamatório em curso, como observado em experimentos onde estes fármacos reduziram os níveis de IL-1 α , IL-1 β , IL-2 e IL-17 e aumentaram os níveis de IL-6, IL-10, INF- γ e TNF- α (GIRIDHARAN et al., 2020).

Além do processo inflamatório, os antipsicóticos podem modular diversos mecanismos celulares por diferentes vias de sinalização. A HMGB1 é uma alarmina que atua como reguladora da transcrição nuclear e como mensageiro celular desempenhando um papel importante nas respostas imunes e autofagia, podendo desencadear processos pró-inflamatórios ou favorecer a sobrevivência celular em resposta ao estresse celular (PEDRAZZI et al., 2007; YANG et al., 2013). Assim, a HMGB1 é considerada um mediador pró-inflamatório, pois além de ser liberado por células imunes, atua ativando outras células, inclusive astrócitos e microglia, para sintetizar TNF- α , IL-1, IL-6 e outras moléculas pró-inflamatórias. A tendência ao aumento da expressão de HMGB1 observada no tratamento com 10 μ M de haloperidol pode reforçar o potencial efeito pró-inflamatório deste fármaco. Não foram encontrados estudos que relacionem alterações de HMGB1 em tratamentos com haloperidol, no entanto, um estudo que tratou pacientes esquizofrênicos com risperidona observou uma redução dos níveis séricos de HMGB1, além de uma redução de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , TNF- α e IL-6 que foram relacionados com uma redução dos sintomas associados ao transtorno (ZHU et al., 2015).

A via de sinalização do Nrf2 é ativada por estresse oxidativo e está relacionada a efeitos neuroprotetores através da regulação de genes associados a funções antioxidantes e anti-inflamatórias, incluindo proteínas envolvidas na regulação da síntese e conjugação da GSH, além de induzir a ativação do gene para a enzima HO-1, associada a mecanismos de defesa ao estresse oxidativo (YAMAZAKI et al., 2015). Além disso, o Nrf2 redireciona a glicose e a glutamina para as vias anabólicas, por sinalização da via PI3K/Akt. Quando ativada, esta via aumenta o Nrf2 no núcleo e este então participa de funções metabólicas que promovem a proliferação celular e a citoproteção (MITSUIISHI et al., 2012). O aumento da expressão de Nrf2 nos tratamentos com haloperidol 10 μ M e risperidona 1 μ M pode indicar uma possível mudança no ambiente celular desencadeado por estes fármacos, como um desequilíbrio no estado redox, por exemplo, ou o processo inflamatório observado no perfil de citocinas avaliado. Também é importante destacar que estes fármacos podem estar estimulando, via Nrf2, mecanismos citoprotetores.

Em células gliais, o Nrf2 mostrou-se aumentado quando há aumento da expressão de HO-1 (SYAPIN, 2008). A HO-1 também desempenha um papel importante na proteção celular contra o estresse oxidativo. A superexpressão de HO-

1 está associada à diminuição do processo inflamatório, através da formação de moléculas citoprotetoras como o monóxido de carbono e a bilirrubina, resultantes do catabolismo do heme (CHIABRANDO et al., 2014). A HO-1 também pode aumentar a catalase e conteúdo de GSH, indicando uma participação na homeostasia redox (SCHIPPER et al., 2019). Nossos resultados mostraram um aumento significativo na expressão da HO-1 nos tratamentos com haloperidol e risperidona, indicando um potencial mecanismo compensatório aos efeitos inflamatórios destes fármacos, particularmente na dose de 10 µM de haloperidol.

Em relação ao NF-κB, nossos resultados indicam um aumento na sua expressão no tratamento com haloperidol nas doses 1 e 10 µM. A atividade do NF-κB pode estar associada à ativação da via canônica e dos complexos que contêm as subunidades RelA ou cRel no processo inflamatório. O NF-κB pode apresentar um papel tanto anti-inflamatório como pró-inflamatório. A expressão aumentada da subunidade p50 pode suprimir a produção TNF-α (LAWRENCE, 2009). Um aumento da subunidade p50 do NF-κB no núcleo tem sido relacionado a propriedades anti-inflamatórias, enquanto um aumento de p65 relacionada a processos pró-inflamatórios (RUBIO et al., 2018).

Observou-se um aumento significativo da subunidade p65 no tratamento com haloperidol, indicando um possível perfil pró-inflamatório deste fármaco. Além disso, a participação de NF-κB p65 na regulação negativa da sinalização do Nrf2 pode estar associada a um papel na supressão da expressão de genes anti-inflamatórios pelo NF-κB (LIU; QU; SHEN, 2008). A risperidona apresenta tendência a inibir a regulação positiva de p65 NF-κB (MACDOWELL et al., 2013), o que poderia explicar esta subunidade não ter sido alterada no tratamento com este antipsicótico, reforçando assim, seu possível papel anti-inflamatório.

O tratamento com haloperidol pode aumentar a expressão de receptores adenosinérgicos. A adenosina é um nucleosídeo que surge da degradação do ATP. Esse nucleosídeo se liga aos receptores de adenosina, para modular respostas tanto neuronais quanto gliais (BOBERMIN; ROPPA; QUINCOZES-SANTOS, 2019). A adenosina contribui para a neuromodulação ativando receptores inibitórios A1 ou excitatórios A2a (ANAND; DHIKAV, 2012). No tratamento com haloperidol, observou-se um aumento significativo dos receptores A2a. Estes receptores estão envolvidos com a plasticidade sináptica e quando aumentados atuam na sinalização para a

liberação de citocinas, podendo estar associados ao processo neuroinflamatório (MARTÍ NAVIA et al., 2020). Assim, o aumento da expressão dos receptores A2a pelo haloperidol indicam uma possível participação deste receptor nas ações sobre a resposta inflamatória induzida por este antipsicótico.

Com estas análises é possível inferir que os antipsicóticos risperidona e haloperidol modulam parâmetros neuroquímicos, celulares e moleculares em fatias hipocâmpais e em cultura de astrócitos de ratos Wistar, e estas alterações podem fazer parte do mecanismo de ação e dos efeitos desencadeados por estes antipsicóticos no tratamento de transtornos neuropsiquiátricos. Algumas destas alterações apresentam efeitos positivos ou negativos sobre o ambiente celular, que futuramente poderiam ser levadas em consideração para a escolha do esquema terapêutico adotado para estas condições.

7 CONCLUSÕES

A partir das análises realizadas e dos resultados obtidos, podemos esclarecer alguns eventos neuroquímicos, particularmente astrogliais, dos antipsicóticos risperidona e haloperidol. Dessa forma, as principais conclusões desta dissertação são:

1. Os antipsicóticos, particularmente o haloperidol, estão associados a alterações no metabolismo da glicose e do lactato;
2. Os antipsicóticos nas dosagens testadas não alteraram o metabolismo do glutamato através dos transportadores GLAST e GLT-1, da atividade da enzima GS e do conteúdo de GSH;
3. A proteína sinaptofisina e a atividade da enzima $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$ também não foram alteradas, indicando que os fármacos não foram capazes de influenciar mecanismos associados a neurotransmissão;
4. Os fármacos modularam a secreção de fatores tróficos, como BDNF, GDNF e $\text{TGF-}\beta$;
5. Houve modulação da resposta inflamatória, indicando um efeito pró-inflamatório do haloperidol e anti-inflamatório da risperidona;
6. Os mecanismos de sinalização indicam as vias da AMPK, Nrf2, HO-1 e $\text{NF-}\kappa\text{B}$ como potenciais reguladores dos efeitos neuroquímicos/astrogliais do haloperidol e da risperidona;
7. O haloperidol modula a expressão do receptor A2a, podendo indicar a ação deste receptor nos efeitos pró-inflamatórios deste antipsicótico.

Dessa maneira, nossos achados indicam que o haloperidol e a risperidona modulam importantes parâmetros bioquímicos, celulares e moleculares no hipocampo. Neste sentido, os astrócitos parecem responder ativamente aos antipsicóticos, visto que os resultados obtidos nas culturas de astrócitos adultos corroboraram os resultados obtidos nas fatias hipocâmpais agudas.

PERSPECTIVAS

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, com objetivo de melhorar a compreensão do mecanismo de atuação dos antipsicóticos sobre a funcionalidade astrocitária, têm-se como perspectivas para continuação desta pesquisa:

- Medir o imunocontéudo de proteínas do citoesqueleto como GFAP e vimentina;
- Avaliar o metabolismo do glutamato através da captação de glutamato;
- Aumentar o "n" experimental das análises realizadas pela metodologia de *Western Blot*, bem como o RNAm do gene do HMGB1;
- Avaliar o metabolismo energético através da captação de glicose;
- Avaliar outros parâmetros redox celulares, como enzimas antioxidantes e produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio;
- Avaliar a sinalização dos sistemas de neurotransmissores adenosinérgicos, serotoninérgicos e dopaminérgicos;
- Elucidar possíveis mecanismos de sinalização associados a funcionalidade astrogliial.

REFERÊNCIAS

ABBAS, Abul K.; KUMAR, Vinay; FAUSTO, Nelson. Robbins e Contran – Patologia – Bases Patológicas das Doenças. 8 ed. Elsevier, 2010.

ANAND, K. S.; DHIKAV, V. Hippocampus in health and disease: An overview. **Annals of Indian Academy of Neurology**, v. 15, n. 4, p. 239, 10 jan. 2012.

ANDERSSON, U.; TRACEY, K. J. HMGB1 Is a Therapeutic Target for Sterile Inflammation and Infection. **Annual review of immunology**, v. 29, p. 139–162, 2011.

AOYAMA, K.; WATABE, M.; NAKAKI, T. Regulation of neuronal glutathione synthesis. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 108, n. 3, p. 227–238, nov. 2008.

ARAQUE, A. et al. Gliotransmitters travel in time and space. **Neuron**, v. 81, n. 4, p. 728–739, 19 fev. 2014.

ASHRAF, S. et al. Cytokine and S100B levels in paediatric patients undergoing corrective cardiac surgery with or without total circulatory arrest. **European Journal of Cardio-Thoracic Surgery: Official Journal of the European Association for Cardio-Thoracic Surgery**, v. 16, n. 1, p. 32–37, jul. 1999.

ASTAKHOVA, A. et al. Inhibitors of Oxidative Phosphorylation Modulate Astrocyte Inflammatory Responses through AMPK-Dependent Ptgs2 mRNA Stabilization. **Cells**, v. 8, n. 10, 1 out. 2019.

AUTRY, A. E.; MONTEGGIA, L. M. Brain-derived neurotrophic factor and neuropsychiatric disorders. **Pharmacological Reviews**, v. 64, n. 2, p. 238–258, abr. 2012.

AZIZI, E. et al. Alteration of Serum Levels of Cytokines in Schizophrenic Patients before and after Treatment with Risperidone. **Iranian Journal of Allergy, Asthma, and Immunology**, v. 18, n. 3, p. 262–268, 8 jun. 2019.

BAK, L. K.; SCHOUSBOE, A.; WAAGEPETERSEN, H. S. The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. **Journal of Neurochemistry**, v. 98, n. 3, p. 641–653, 2006.

BARR, A. M. et al. Selective effects of typical antipsychotic drugs on SNAP-25 and synaptophysin in the hippocampal trisynaptic pathway. **The International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 9, n. 4, p. 457–463, ago. 2006.

BÉLANGER, M.; ALLAMAN, I.; MAGISTRETTI, P. J. Brain energy metabolism: focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation. **Cell Metabolism**, v. 14, n. 6, p. 724–738, 7 dez. 2011.

BÉLANGER, M.; MAGISTRETTI, P. J. The role of astroglia in neuroprotection. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 11, n. 3, p. 281–295, set. 2009.

BELLAVER, B. et al. Resveratrol increases antioxidant defenses and decreases

proinflammatory cytokines in hippocampal astrocyte cultures from newborn, adult and aged Wistar rats. **Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA**, v. 28, n. 4, p. 479–484, jun. 2014.

BERGERSEN, L. H. Lactate Transport and Signaling in the Brain: Potential Therapeutic Targets and Roles in Body—Brain Interaction: **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, 26 nov. 2014.

BINDER, D. K.; SCHARFMAN, H. E. Brain-derived Neurotrophic Factor. **Growth factors (Chur, Switzerland)**, v. 22, n. 3, p. 123–131, set. 2004.

BLASKO, I. et al. How chronic inflammation can affect the brain and support the development of Alzheimer's disease in old age: the role of microglia and astrocytes. **Aging Cell**, v. 3, n. 4, p. 169–176, ago. 2004.

BOBERMIN, L. D. et al. Differential effects of typical and atypical antipsychotics on astroglial cells in vitro. **International Journal of Developmental Neuroscience: The Official Journal of the International Society for Developmental Neuroscience**, v. 69, p. 1–9, out. 2018.

BOBERMIN, L. D.; ROPPA, R. H. A.; QUINCOZES-SANTOS, A. Adenosine receptors as a new target for resveratrol-mediated glioprotection. **Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease**, v. 1865, n. 3, p. 634–647, 01 2019.

BODNAR, T. S. et al. Immune network dysregulation associated with child neurodevelopmental delay: modulatory role of prenatal alcohol exposure. **Journal of Neuroinflammation**, v. 17, n. 1, p. 39, 28 jan. 2020.

BOLAÑOS, J. P. Bioenergetics and redox adaptations of astrocytes to neuronal activity. **Journal of Neurochemistry**, v. 139, n. S2, p. 115–125, 2016.

BRAMANTI, V. et al. Biomarkers of glial cell proliferation and differentiation in culture. **Frontiers in Bioscience (Scholar Edition)**, v. 2, p. 558–570, 1 jan. 2010.

BROWNE, R. W.; ARMSTRONG, D. Reduced glutathione and glutathione disulfide. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, v. 108, p. 347–352, 1998.

BUDNI, J. et al. The involvement of BDNF, NGF and GDNF in aging and Alzheimer's disease. **Aging and Disease**, v. 6, n. 5, p. 331–341, set. 2015.

CARVALHO, A. L. et al. Role of the brain-derived neurotrophic factor at glutamatergic synapses. **British Journal of Pharmacology**, v. 153 Suppl 1, p. S310-324, mar. 2008.

CHAN, K. M.; DELFERT, D.; JUNGER, K. D. A direct colorimetric assay for Ca²⁺ -stimulated ATPase activity. **Analytical Biochemistry**, v. 157, n. 2, p. 375–380, set. 1986.

CHIABRANDO, D. et al. Heme in pathophysiology: a matter of scavenging, metabolism and trafficking across cell membranes. **Frontiers in Pharmacology**, v. 5, 2014.

CUI, X.; XIE, Z. Protein Interaction and Na/K-ATPase-Mediated Signal Transduction. **Molecules : A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry**, v. 22, n. 6, 14 jun. 2017.

DA CRUZ JUNG, I. E. et al. Haloperidol and Risperidone at high concentrations activate an in vitro inflammatory response of RAW 264.7 macrophage cells by induction of apoptosis and modification of cytokine levels. **Psychopharmacology**, v. 233, n. 9, p. 1715–1723, maio 2016.

DE SOUZA, D. F. et al. Interleukin-6-induced S100B secretion is inhibited by haloperidol and risperidone. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 43, p. 14–22, 3 jun. 2013.

DEVERMAN, B. E.; PATTERSON, P. H. Cytokines and CNS development. **Neuron**, v. 64, n. 1, p. 61–78, 15 out. 2009.

DIENEL, G. A. Astrocytic energetics during excitatory neurotransmission: What are contributions of glutamate oxidation and glycolysis? **Neurochemistry international**, v. 63, n. 4, p. 244–258, out. 2013.

DIENEL, G. A. Brain Glucose Metabolism: Integration of Energetics with Function. **Physiological Reviews**, v. 99, n. 1, p. 949–1045, 19 dez. 2018.

DINIZ, L. P. et al. Astrocytes and the TGF- β 1 Pathway in the Healthy and Diseased Brain: a Double-Edged Sword. **Molecular Neurobiology**, v. 56, n. 7, p. 4653–4679, jul. 2019.

DONATO, R. et al. Functions of S100 proteins. **Current Molecular Medicine**, v. 13, n. 1, p. 24–57, jan. 2013.

DOS SANTOS, A. Q. et al. Resveratrol increases glutamate uptake and glutamine synthetase activity in C6 glioma cells. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 453, n. 2, p. 161–167, 15 set. 2006.

DRINGEN, R. et al. Glutathione-Dependent Detoxification Processes in Astrocytes. **Neurochemical Research**, v. 40, n. 12, p. 2570–2582, 1 dez. 2015.

DRINGEN, R.; GUTTERER, J. M.; HIRRLINGER, J. Glutathione metabolism in brain. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 16, p. 4912–4916, 2000.

EASTWOOD, S. L.; CAIRNS, N. J.; HARRISON, P. J. Synaptophysin gene expression in schizophrenia. Investigation of synaptic pathology in the cerebral cortex. **The British Journal of Psychiatry: The Journal of Mental Science**, v. 176, p. 236–242, mar. 2000.

EDWARDS, M. M.; ROBINSON, S. R. TNF alpha affects the expression of GFAP and S100B: implications for Alzheimer's disease. **Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)**, v. 113, n. 11, p. 1709–1715, nov. 2006.

EGBUJO, C. N.; SINCLAIR, D.; HAHN, C.-G. Dysregulations of Synaptic Vesicle Trafficking in Schizophrenia. **Current Psychiatry Reports**, v. 18, n. 8, p. 77, 2016.

FAVALLI, G. et al. The role of BDNF in the pathophysiology and treatment of schizophrenia. **Journal of Psychiatric Research**, v. 46, n. 1, p. 1–11, jan. 2012.

FELTEN, D. L.; SHETTY, A. N. Atlas of Neuroscience. ELSEVIER (MEDICINA), 2003.

FOGWE, L. A.; REDDY, V.; MESFIN, F. B. Neuroanatomy, Hippocampus. In: **StatPearls**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2020.

FRUMAN, D. A. et al. The PI3K Pathway in Human Disease. **Cell**, v. 170, n. 4, p. 605–635, 10 ago. 2017.

GAWLIK-KOTELNICKA, O. et al. Impact of lithium alone or in combination with haloperidol on oxidative stress parameters and cell viability in SH-SY5Y cell culture. **Acta Neuropsychiatrica**, v. 28, n. 1, p. 38–44, fev. 2016.

GESSI, S. et al. A1 and A3 adenosine receptors inhibit LPS-induced hypoxia-inducible factor-1 accumulation in murine astrocytes. **Pharmacological Research**, v. 76, p. 157–170, 1 out. 2013.

GIRIDHARAN, V. V. et al. Clozapine Prevents Poly (I:C) Induced Inflammation by Modulating NLRP3 Pathway in Microglial Cells. **Cells**, v. 9, n. 3, 28 2020.

GOGTAY, N. et al. Age of Onset of Schizophrenia: Perspectives From Structural Neuroimaging Studies. **Schizophrenia Bulletin**, v. 37, n. 3, p. 504–513, maio 2011.

GONÇALVES, J. T.; SCHAFER, S. T.; GAGE, F. H. Adult Neurogenesis in the Hippocampus: From Stem Cells to Behavior. **Cell**, v. 167, n. 4, p. 897–914, 3 nov. 2016.

GORINA, R. et al. Astrocyte TLR4 activation induces a proinflammatory environment through the interplay between MyD88-dependent NFκB signaling, MAPK, and Jak1/Stat1 pathways. **Glia**, v. 59, n. 2, p. 242–255, 2011.

GRACE, A. A.; GOMES, F. V. The Circuitry of Dopamine System Regulation and its Disruption in Schizophrenia: Insights Into Treatment and Prevention. **Schizophrenia Bulletin**, v. 45, n. 1, p. 148–157, jan. 2019.

GUO, X. et al. The AMPK-PGC-1α signaling axis regulates the astrocyte glutathione system to protect against oxidative and metabolic injury. **Neurobiology of Disease**, v. 113, p. 59–69, 2018.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Tratado de Fisiologia Médica. 12 ed. São Paulo: Elsevier, 2011.

HARADA, K.; KAMIYA, T.; TSUBOI, T. Gliotransmitter Release from Astrocytes: Functional, Developmental, and Pathological Implications in the Brain. **Frontiers in Neuroscience**, v. 9, 12 jan. 2016.

HARDIE, D. G. AMPK—Sensing Energy while Talking to Other Signaling Pathways. **Cell Metabolism**, v. 20, n. 6, p. 939–952, 2 dez. 2014.

HEFNER, G. et al. Inflammation and psychotropic drugs: the relationship between C-reactive protein and antipsychotic drug levels. **Psychopharmacology**, v. 233, n. 9, p. 1695–1705, maio 2016.

HERTZ, L. Glutamate, a neurotransmitter--and so much more. A synopsis of Wierzba III. **Neurochemistry International**, v. 48, n. 6–7, p. 416–425, jun. 2006.

HORWOOD, J. M. et al. Signalling mechanisms mediated by the phosphoinositide 3-kinase/Akt cascade in synaptic plasticity and memory in the rat. **The European Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 12, p. 3375–3384, jun. 2006.

IGLESIAS, J.; MORALES, L.; BARRETO, G. E. Metabolic and Inflammatory Adaptation of Reactive Astrocytes: Role of PPARs. **Molecular Neurobiology**, v. 54, n. 4, p. 2518–2538, maio 2017.

ISOLAN, G. R. et al. Anatomia microcirúrgica do hipocampo na Amígdalo-hipocampectomia seletiva sob a perspectiva da técnica de Niemeyer e método pré-operatório para maximizar a corticotomia. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 65, n. 4A, p. 1062–1069, dez. 2007.

JASSIM, G. et al. Acute effects of orexigenic antipsychotic drugs on lipid and carbohydrate metabolism in rat. **Psychopharmacology**, v. 219, n. 3, p. 783–794, 1 fev. 2012.

JHA, M. K.; MORRISON, B. M. Glia-neuron energy metabolism in health and diseases: New insights into the role of nervous system metabolic transporters. **Experimental neurology**, v. 309, p. 23–31, nov. 2018.

JURCOVICOVA, J. Glucose transport in brain – effect of inflammation. **Endocrine Regulations**, v. 48, n. 01, p. 35–48, 2014.

KARIN, M.; DELHASE, M. The I κ B kinase (IKK) and NF- κ B: key elements of proinflammatory signalling. **Seminars in Immunology**, v. 12, n. 1, p. 85–98, 1 fev. 2000.

KARLSSON, R.-M.; HEILIG, M.; HOLMES, A. Loss of glutamate transporter GLAST (EAAT1) causes locomotor hyperactivity and exaggerated responses to psychotomimetics: rescue by haloperidol and mGlu2/3 agonist. **Biological psychiatry**, v. 64, n. 9, p. 810–814, 1 nov. 2008.

KEILHOFF, G.; FUSAR-POLI, P.; BECKER, A. Effects of Antipsychotics on Dentate Gyrus Stem Cell Proliferation and Survival in Animal Models: A Critical Update. **Neural Plasticity**, v. 2012, 2012.

KHAKH, B. S.; SOFRONIEW, M. V. Diversity of astrocyte functions and phenotypes in neural circuits. **Nature Neuroscience**, v. 18, n. 7, p. 942–952, jul. 2015.

KUSUMI, I.; BOKU, S.; TAKAHASHI, Y. Psychopharmacology of atypical antipsychotic drugs: From the receptor binding profile to neuroprotection and neurogenesis. **Psychiatry and Clinical Neurosciences**, v. 69, n. 5, p. 243–258, 2015.

LAWRENCE, T. The Nuclear Factor NF- κ B Pathway in Inflammation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 1, n. 6, dez. 2009.

LEAL, G.; BRAMHAM, C. R.; DUARTE, C. B. BDNF and Hippocampal Synaptic Plasticity. **Vitamins and Hormones**, v. 104, p. 153–195, 2017.

LEDDA, F. et al. GDNF and GFR α 1 promote formation of neuronal synapses by ligand-induced cell adhesion. **Nature Neuroscience**, v. 10, n. 3, p. 293–300, mar. 2007.

LEE, H.-Y.; KIM, Y.-K. Effect of TGF- β 1 polymorphism on the susceptibility to schizophrenia and treatment response to atypical antipsychotic agent. **Acta Neuropsychiatrica**, v. 22, n. 4, p. 174–179, 2010.

LEITE, M. C. et al. A simple, sensitive and widely applicable ELISA for S100B: Methodological features of the measurement of this glial protein. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 169, n. 1, p. 93–99, 30 mar. 2008.

LEKE, R.; SCHOUSBOE, A. The Glutamine Transporters and Their Role in the Glutamate/GABA–Glutamine Cycle. In: SCHOUSBOE, A.; SONNEWALD, U. (Eds.). . **The Glutamate/GABA-Glutamine Cycle: Amino Acid Neurotransmitter Homeostasis**. Advances in Neurobiology. Cham: Springer International Publishing, 2016. p. 223–257.

LI, H. et al. IL-23 and TGF- β 1 levels as potential predictive biomarkers in treatment of bipolar I disorder with acute manic episode. **Journal of Affective Disorders**, v. 174, p. 361–366, 15 mar. 2015.

LI, P.; SNYDER, G. L.; VANOVER, K. E. Dopamine Targeting Drugs for the Treatment of Schizophrenia: Past, Present and Future. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 29, p. 3385–3403, 2016.

LIDDELL, J. R. Are Astrocytes the Predominant Cell Type for Activation of Nrf2 in Aging and Neurodegeneration? **Antioxidants**, v. 6, n. 3, 18 ago. 2017.

LIU, G.-H.; QU, J.; SHEN, X. NF- κ B/p65 antagonizes Nrf2-ARE pathway by depriving CBP from Nrf2 and facilitating recruitment of HDAC3 to MafK. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1783, n. 5, p. 713–727, maio 2008.

LIU, J.; LILLY, M. N.; SHAPIRO, J. I. Targeting Na/K-ATPase Signaling: A New Approach to Control Oxidative Stress. **Current pharmaceutical design**, v. 24, n. 3, p. 359–364, 2018.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–275, nov. 1951.

MACDOWELL, K. S. et al. Risperidone normalizes increased inflammatory parameters and restores anti-inflammatory pathways in a model of neuroinflammation. **The International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 16, n. 1, p. 121–135, fev. 2013.

MARAGAKIS, N. J.; ROTHSTEIN, J. D. Mechanisms of Disease: astrocytes in neurodegenerative disease. **Nature Clinical Practice. Neurology**, v. 2, n. 12, p. 679–689, dez. 2006.

MARKIEWICZ, I.; LUKOMSKA, B. The role of astrocytes in the physiology and pathology of the central nervous system. **Acta Neurobiologiae Experimentalis**, v. 66, n. 4, p. 343–358, 2006.

MARTÍ NAVIA, A. et al. Adenosine Receptors as Neuroinflammation Modulators: Role of A1 Agonists and A2A Antagonists. **Cells**, v. 9, n. 7, 21 jul. 2020.

MENET, V. et al. Inactivation of the glial fibrillary acidic protein gene, but not that of vimentin, improves neuronal survival and neurite growth by modifying adhesion molecule expression. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 21, n. 16, p. 6147–6158, 15 ago. 2001.

MICHETTI, F. et al. The S100B story: from biomarker to active factor in neural injury. **Journal of Neurochemistry**, v. 148, n. 2, p. 168–187, 2019.

MIDDELDORP, J.; HOL, E. M. GFAP in health and disease. **Progress in Neurobiology**, v. 93, n. 3, p. 421–443, mar. 2011.

MITCHELL, S.; VARGAS, J.; HOFFMANN, A. Signaling via the NFκB system. **Wiley Interdisciplinary Reviews. Systems Biology and Medicine**, v. 8, n. 3, p. 227–241, 2016.

MITSUISHI, Y. et al. Nrf2 Redirects Glucose and Glutamine into Anabolic Pathways in Metabolic Reprogramming. **Cancer Cell**, v. 22, n. 1, p. 66–79, 10 jul. 2012.

MOLOFSKY, A. V. et al. Astrocytes and disease: a neurodevelopmental perspective. **Genes & Development**, v. 26, n. 9, p. 891–907, 5 jan. 2012.

MOMTAZMANESH, S.; ZARE-SHAHABADI, A.; REZAEI, N. Cytokine Alterations in Schizophrenia: An Updated Review. **Frontiers in Psychiatry**, v. 10, p. 892, 2019.

MÜLLER, N.; MYINT, A.-M.; SCHWARZ, M. J. The impact of neuroimmune dysregulation on neuroprotection and neurotoxicity in psychiatric disorders - relation to drug treatment. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 11, n. 3, p. 319–332, set. 2009.

NAMJOO, E. et al. Haloperidol's Effect on the Expressions of TGFB, NT-3, and BDNF genes in Cultured Rat Microglia. **Basic and Clinical Neuroscience**, v. 11, n. 1, p. 49–58, 10 jan. 2020.

NANDRA, K. S.; AGIUS, M. The differences between typical and atypical antipsychotics: the effects on neurogenesis. **Psychiatra Danubina**, v. 24 Suppl 1, p. S95-99, set. 2012.

NARDIN, P. et al. S100B Secretion in Acute Brain Slices: Modulation by Extracellular Levels of Ca²⁺ and K⁺. **Neurochemical Research**, v. 34, n. 9, p. 1603–1611, 1 set. 2009.

NARDIN, P. et al. In vitro S100B secretion is reduced by apomorphine: effects of antipsychotics and antioxidants. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 35, n. 5, p. 1291–1296, 1 jul. 2011.

OLIVEIRA, I. R. Antipsicóticos atípicos: farmacologia e uso clínico. **Rev Bras Psiquiatr**, p. 3, 2000.

OZDEMIR, H. et al. Differential effects of antipsychotics on hippocampal presynaptic protein expressions and recognition memory in a schizophrenia model in mice. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 39, n. 1, p. 62–68, 1 out. 2012.

PARPURA, V.; VERKHRATSKY, A. Astrocytes revisited: concise historic outlook on glutamate homeostasis and signaling. **Croatian Medical Journal**, v. 53, n. 6, p. 518–528, dez. 2012.

PEDRAZZI, M. et al. Selective Proinflammatory Activation of Astrocytes by High-Mobility Group Box 1 Protein Signaling. **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 12, p. 8525–8532, 15 dez. 2007.

PEKKNY, M. Astrocytic intermediate filaments: lessons from GFAP and vimentin knock-out mice. **Progress in Brain Research**, v. 132, p. 23–30, 2001.

PEKKNY, M. et al. Astrocytes: a central element in neurological diseases. **Acta Neuropathologica**, v. 131, n. 3, p. 323–345, mar. 2016.

PELLERIN, L. Lactate as a pivotal element in neuron–glia metabolic cooperation. **Neurochemistry International**, Glutamine, Glutamate and GABA in the CNS: Transport and Metabolism in Health and Disease. v. 43, n. 4, p. 331–338, 1 set. 2003.

PELLERIN, L. How Astrocytes Feed Hungry Neurons. **Molecular Neurobiology**, v. 32, n. 1, p. 059–072, 2005.

PEREA, G.; ARAQUE, A. Glial calcium signaling and neuron–glia communication. **Cell Calcium**, v. 38, n. 3–4, p. 375–382, out. 2005.

PEREGO, C. et al. The GLT-1 and GLAST Glutamate Transporters Are Expressed on Morphologically Distinct Astrocytes and Regulated by Neuronal Activity in Primary Hippocampal Cocultures. **Journal of Neurochemistry**, v. 75, n. 3, p. 1076–1084, 2000.

PETRELLI, F.; PUCCI, L.; BEZZI, P. Astrocytes and Microglia and Their Potential Link

with Autism Spectrum Disorders. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 10, 2016.

PINACHO, R. et al. The glial phosphorylase of glycogen isoform is reduced in the dorsolateral prefrontal cortex in chronic schizophrenia. **Schizophrenia Research, Post-mortem Pathology in Schizophrenia**. v. 177, n. 1, p. 37–43, 1 nov. 2016.

POMPURA, S. L.; DOMINGUEZ-VILLAR, M. The PI3K/AKT signaling pathway in regulatory T-cell development, stability, and function. **Journal of Leukocyte Biology**, 22 jan. 2018.

PÖYHÖNEN, S. et al. Effects of Neurotrophic Factors in Glial Cells in the Central Nervous System: Expression and Properties in Neurodegeneration and Injury. **Frontiers in Physiology**, v. 10, p. 486, 2019.

PROIA, P. et al. Lactate as a Metabolite and a Regulator in the Central Nervous System. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 9, 1 set. 2016.

QUINCOZES-SANTOS, A. et al. Effect of the atypical neuroleptic risperidone on morphology and S100B secretion in C6 astroglial lineage cells. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 314, n. 1–2, p. 59–63, jul. 2008.

QUINCOZES-SANTOS, A. et al. Atypical neuroleptic risperidone modulates glial functions in C6 astroglial cells. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 33, n. 1, p. 11–15, 1 fev. 2009.

QUINCOZES-SANTOS, A. et al. Effects of atypical (risperidone) and typical (haloperidol) antipsychotic agents on astroglial functions. **European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience**, v. 260, n. 6, p. 475–481, set. 2010.

QUINCOZES-SANTOS, A. et al. Oxidative stress mediated by NMDA, AMPA/KA channels in acute hippocampal slices: neuroprotective effect of resveratrol. **Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA**, v. 28, n. 4, p. 544–551, jun. 2014.

RIMMELE, T. S.; ROSENBERG, P. A. GLT-1: The elusive presynaptic glutamate transporter. **Neurochemistry international**, v. 98, p. 19–28, set. 2016.

ROSE, C. R. et al. Molecular and cellular physiology of sodium-dependent glutamate transporters. **Brain Research Bulletin, Molecular mechanisms of astrocyte-neuron signalling**. v. 136, p. 3–16, 1 jan. 2018.

ROSE, D.; ASHWOOD, P. Potential cytokine biomarkers in autism spectrum disorders. **Biomarkers in Medicine**, v. 8, n. 9, p. 1171–1181, 2014.

RUBIO, V. et al. Different roles of Nrf2 and NFkB in the antioxidant imbalance produced by esculetin or quercetin on NB4 leukemia cells. **Chemico-Biological Interactions**, v. 294, p. 158–166, 1 out. 2018.

RUGGIERO, R. N. et al. Neurotransmissão glutamatérgica e plasticidade sináptica: aspectos moleculares, clínicos e filogenéticos. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v. 44, n. 2,

p. 143–156, 30 jun. 2011.

RUTZ, S.; OUYANG, W. Regulation of Interleukin-10 Expression. In: MA, X. (Ed.). . **Regulation of Cytokine Gene Expression in Immunity and Diseases**. Advances in Experimental Medicine and Biology. Dordrecht: Springer Netherlands, 2016. p. 89–116.

SÁNCHEZ-ALEGRÍA, K. et al. PI3K Signaling in Neurons: A Central Node for the Control of Multiple Functions. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 12, 23 nov. 2018.

SANTOS, É. G. DOS; SIQUEIRA, M. M. DE. Prevalência dos transtornos mentais na população adulta brasileira: uma revisão sistemática de 1997 a 2009. **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**, v. 59, n. 3, p. 238–246, 2010.

SCHIPPER, H. M. et al. The sinister face of heme oxygenase-1 in brain aging and disease. **Progress in Neurobiology**, v. 172, p. 40–70, 1 jan. 2019.

SCHMITT, K. R. L. et al. S100B modulates IL-6 release and cytotoxicity from hypothermic brain cells and inhibits hypothermia-induced axonal outgrowth. **Neuroscience Research**, v. 59, n. 1, p. 68–73, set. 2007.

SEO, M. K. et al. Effects of antipsychotic drugs on the expression of synapse-associated proteins in the frontal cortex of rats subjected to immobilization stress. **Psychiatry Research**, v. 229, n. 3, p. 968–974, 30 out. 2015.

SHAO, Z. et al. Antipsychotic drugs cause glial cell line-derived neurotrophic factor secretion from C6 glioma cells. **Journal of Psychiatry and Neuroscience**, v. 31, n. 1, p. 32–37, jan. 2006.

SIGFRIDSSON, E. et al. Astrocyte-specific overexpression of Nrf2 protects against optic tract damage and behavioural alterations in a mouse model of cerebral hypoperfusion. **Scientific Reports**, v. 8, 22 ago. 2018.

SILVA, R. C. B. DA. Esquizofrenia: uma revisão. **Psicologia USP**, v. 17, n. 4, p. 263–285, 2006.

SKYTT, D. M. et al. Characterization of primary and secondary cultures of astrocytes prepared from mouse cerebral cortex. **Neurochemical Research**, v. 35, n. 12, p. 2043–2052, dez. 2010.

SOFRONIEW, M. V. Astrocyte barriers to neurotoxic inflammation. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 16, n. 5, p. 249–263, maio 2015.

SONG, X. et al. Changes in pro-inflammatory cytokines and body weight during 6-month risperidone treatment in drug naïve, first-episode schizophrenia. **Psychopharmacology**, v. 231, n. 2, p. 319–325, 1 jan. 2014.

SOUZA, D. G. et al. Characterization of adult rat astrocyte cultures. **PloS One**, v. 8, n. 3, p. e60282, 2013.

STAPEL, B. et al. Second generation atypical antipsychotics olanzapine and aripiprazole reduce expression and secretion of inflammatory cytokines in human immune cells. **Journal of Psychiatric Research**, v. 105, p. 95–102, 2018.

STEINER, J. et al. Haloperidol and clozapine decrease S100B release from glial cells. **Neuroscience**, v. 167, n. 4, p. 1025–1031, 2 jun. 2010.

STEINER, J. et al. Os possíveis papéis da S100B na esquizofrenia. **Archives of Clinical Psychiatry (São Paulo)**, v. 40, n. 1, p. 35–40, 2013.

SUGINO, H. et al. Atypical antipsychotics suppress production of proinflammatory cytokines and up-regulate interleukin-10 in lipopolysaccharide-treated mice. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 33, n. 2, p. 303–307, 17 mar. 2009.

SYAPIN, P. J. Regulation of haeme oxygenase-1 for treatment of neuroinflammation and brain disorders. **British Journal of Pharmacology**, v. 155, n. 5, p. 623–640, nov. 2008.

TAUFFENBERGER, A. et al. Lactate and pyruvate promote oxidative stress resistance through hormetic ROS signaling. **Cell Death & Disease**, v. 10, n. 9, p. 1–16, 10 set. 2019.

TOYAMA, E. Q. et al. AMP-activated protein kinase mediates mitochondrial fission in response to energy stress. **Science (New York, N.Y.)**, v. 351, n. 6270, p. 275–281, 15 jan. 2016.

VIJAYAN, V.; WAGENER, F. A. D. T. G.; IMMENSCHUH, S. The macrophage heme-heme oxygenase-1 system and its role in inflammation. **Biochemical Pharmacology**, Diamond Jubilee Special Issue: Celebrating 60 Years of Excellence. v. 153, p. 159–167, 1 jul. 2018.

VILLEGAS, S. N.; POLETTA, F. A.; CARRI, N. G. GLIA: A reassessment based on novel data on the developing and mature central nervous system. **Cell Biology International**, v. 27, n. 8, p. 599–609, 2003.

WANG, D. D.; BORDEY, A. The Astrocyte Odyssey. **Progress in neurobiology**, v. 86, n. 4, p. 342–367, dez. 2008.

WIBLE, C. G. Hippocampal Physiology, Structure and Function and the Neuroscience of Schizophrenia: A Unified Account of Declarative Memory Deficits, Working Memory Deficits and Schizophrenic Symptoms. **Behavioral Sciences**, v. 3, n. 2, p. 298–315, jun. 2013.

WYSE, A. T. et al. Methylmalonate administration decreases Na⁺,K⁺-ATPase activity in cerebral cortex of rats. **Neuroreport**, v. 11, n. 10, p. 2331–2334, 14 jul. 2000.

XU, S. et al. Glial Cells: Role of the Immune Response in Ischemic Stroke. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 26 fev. 2020.

YAMAZAKI, H. et al. Role of the Keap1/Nrf2 pathway in neurodegenerative diseases. **Pathology International**, v. 65, n. 5, p. 210–219, 2015.

YANG, H. et al. The many faces of HMGB1: molecular structure-functional activity in inflammation, apoptosis, and chemotaxis. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 93, n. 6, p. 865–873, 2013.

YE, F. et al. Altered serum levels of glial cell line-derived neurotrophic factor in male chronic schizophrenia patients with tardive dyskinesia. **International Journal of Methods in Psychiatric Research**, v. 27, n. 4, 14 jun. 2018.

YOUNG, B. **Wheater Histologia Funcional**. Elsevier Health Sciences Brazil, 474p., 2011. ISBN 9788535245745.

ZANOTTO, C. et al. Non-specific inhibitors of aquaporin-4 stimulate S100B secretion in acute hippocampal slices of rats. **Brain Research**, v. 1491, p. 14–22, 23 jan. 2013.

ZHU, Q. et al. [Analysis of the changes of serum high mobility group protein B1 and cytokines in first-episode schizophrenia patients]. **Zhonghua Yi Xue Za Zhi**, v. 95, n. 47, p. 3818–3822, 15 dez. 2015.

ZHU, X. et al. Changes and Significance of SYP and GAP-43 Expression in the Hippocampus of CIH Rats. **International Journal of Medical Sciences**, v. 16, n. 3, p. 394–402, 29 jan. 2019.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Efeitos da risperidona e do haloperidol na viabilidade celular	25
Figura 2: Efeitos da risperidona e do haloperidol no consumo celular de glicose	26
Figura 3: Efeito dos antipsicóticos sobre a liberação de lactato	27
Figura 4: Efeitos da risperidona e do haloperidol sobre o imunocontéudo dos transportadores astrocitários GLAST (A) e GLT-1 (B)	28
Figura 5: Efeitos da risperidona e do haloperidol sobre a atividade da GS	29
Figura 6: Efeitos da risperidona e do haloperidol sobre o conteúdo de GSH intracelular	29
Figura 7: Efeitos da risperidona e do haloperidol sobre o conteúdo de GSH extracelular	30
Figura 8: Efeitos da risperidona e do haloperidol sobre a atividade da enzima Na ⁺ K ⁺ -ATPase	31
Figura 9: Efeitos da risperidona e do haloperidol sobre a liberação de fatores tróficos	32
Figura 10: Efeitos da risperidona e do haloperidol sobre a resposta inflamatória	33
Figura 11: Efeitos da risperidona e do haloperidol sobre a expressão de HMGB1	34
Figura 12: Efeitos da risperidona e do haloperidol sobre o imunocontéudo de fosfo-PI3K	34
Figura 13: Efeitos da risperidona e do haloperidol sobre a expressão da AMPK	35
Figura 14: Efeitos da risperidona e do haloperidol sobre a expressão da Nrf2	36
Figura 15: Efeitos da risperidona e do haloperidol sobre a expressão da HO-1	36
Figura 16: Efeitos da risperidona e do haloperidol sobre a expressão do NF-kB p50 e p65	37
Figura 17: Efeitos da risperidona e do haloperidol sobre a expressão de receptores de adenosina A1 (A), A2a (B), A2b (C) e A3 (D)	38
Figura 18: Efeitos da risperidona e do haloperidol sobre o imunocontéudo de sinaptofisina	39
Figura 19: Efeitos da risperidona e do haloperidol na viabilidade celular e na liberação de lactato em culturas de astrócitos	40
Figura 20: Efeitos da risperidona e do haloperidol sobre a atividade da enzima Na ⁺ K ⁺ -ATPase em culturas de astrócitos	40

Figura 21: Efeitos da risperidona e do haloperidol sobre a secreção de fatores tróficos em culturas de astrócitos 41

Figura 22: Efeitos da risperidona e do haloperidol sobre a resposta inflamatória em culturas de astrócitos 42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resumo dos resultados em fatias hipocampais e em cultura de células 43