



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

GABRIELA SEABRA

AVALIAÇÃO DO EFEITO DE ANTIPSICÓTICOS EM
CULTURA DE OLIGODENDRÓCITOS HUMANOS, ATRAVÉS
DE ANÁLISES DE PROTEOMA

EVALUATING ANTIPSYCHOTICS EFFECTS ON A HUMAN
OLIGODENDROCYTE CULTURE, THROUGH PROTEOME
ANALYSES

Campinas,
2019

GABRIELA SEABRA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DE ANTIPSICÓTICOS EM CULTURA DE
OLIGODENDRÓCITOS HUMANOS, ATRAVÉS DE ANÁLISES DE
PROTEOMA**

**EVALUATING ANTIPSYCHOTICS EFFECTS ON A HUMAN
OLIGODENDROCYTE CULTURE, THROUGH PROTEOME
ANALYSES**

*Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas como parte dos
requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra
em Biologia Funcional e Molecular, na Área de
Bioquímica.*

*Dissertation presented to the Institute of Biology of the
University of Campinas as part of the requisites required
to obtain of Master's degree in Functional and Molecular
Biology in the area of Biochemistry.*

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA
PELA ALUNA GABRIELA SEABRA E
ORIENTADA PELO PROFESSOR DANIEL
MARTINS DE SOUZA

Orientador: DANIEL MARTINS DE SOUZA

CAMPINAS

(2019)

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

Se11a Seabra, Gabriela, 1994-
Avaliação do efeito de antipsicóticos em cultura de oligodendrócitos humanos, através de análises de proteoma / Gabriela Seabra. – Campinas, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: Daniel Martins de Souza.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Esquizofrenia. 2. Clozapina. 3. Haloperidol. 4. D-serina. 5. Espectrometria de massa. I. Martins-de-Souza, Daniel, 1979-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Evaluating antipsychotics effects on a human oligodendrocyte culture, through proteome analyses

Palavras-chave em inglês:

Schizophrenia

Clozapine

Haloperidol

D-serine

Mass spectrometry

Área de concentração: Bioquímica

Titulação: Mestra em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Daniel Martins de Souza [Orientador]

Alexandre Bruni Cardoso

André Schwambach Vieira

Data de defesa: 01-07-2019

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0001-5877-4533>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/3914118927423248>

Campinas, 01 de Julho de 2019

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Daniel Martins de Souza

Prof. Dr. André Schwambach Vieira

Prof. Dr. Alexandre Bruni Cardoso

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Christinna e Armando, que sempre estiveram presentes apesar da distância. Juntos sonhamos e realizamos tanto, sempre tendo o amor como base. Sem vocês, nada seria possível.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas, o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.” (Madre Teresa de Calcutá)

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 1691474.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) (2013/08711-3, 2014/10068-4), ao Instituto Serrapilheira (Serra-1709-16349) e ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) (302453/2017-2) pelos financiamentos que possibilitam a pesquisa no Laboratório de Neuroproteômica (LNP).

Ao meu orientador, Prof. Dr. Daniel Martins de Souza, por todas as oportunidades proporcionadas ao longo do mestrado. Primeiramente, por me receber no laboratório, pela orientação e discussões, pelas oportunidades de participação em congressos, cursos, colaborações, artigos e capítulos. Nunca cresci tanto profissional e pessoalmente como nesses dois anos. Obrigada pelos conselhos e orientação, por todas as contribuições, apoio e compreensão. O LNP sempre terá um lugar especial na minha memória e no meu coração, e tenho certeza que cada dia mais será referência científica, não só no Brasil, mas no mundo.

Aos meus colegas de laboratório, pela companhia, dicas, ajudas e discussões, tanto acadêmicas quanto pessoais. A convivência diária com vocês foi fundamental ao longo desses dois anos. Agradeço em especial à Dani Junqueira e Ana Carol pelas conversas, açaís e ajuda nos experimentos e na vida; à Carol Brandão, minha companheira de PED, shows, bioquímica e Muay Thai; à Giu Zucolli, pelas conversas, ajudas com protocolos e colaborações, comidas gostosas e conselhos de séries; à Dra. Juliana Minardi pelas orientações em relação à cultura de células, protocolos, e curiosidades científicas diversas; Ao Gui Reis pelas ajudas com o massas e incontáveis risadas.

À Dra. Mariana Fioramonte, fundamental no quesito de espectrometria de massas, sempre nos treinando e orientando com atenção, e nos ajudando a resolver os mais diversos problemas com muita proatividade. Espectrometria de massas é uma técnica complexa, e ainda tenho muito o que aprender, mas graças à você e seus treinamentos, aprendi muito e descobri novas áreas de interesse. Obrigada também

pelas histórias, conselhos, risadas e por organizar diversas confraternizações do laboratório.

À Dra. Juliana Cassoli (JuCa), por toda ajuda e apoio na primeira metade do mestrado. Sob sua orientação, dei os primeiros passos na espectrometria de massas e no laboratório. Obrigada por ter sido um “pedacinho do ES” em tantos momentos e conversas.

À minha co-orientadora, Dra. Valéria de Almeida, por todo o apoio, orientação, amizade e companhia nos experimentos e na vida. Tenho uma profunda admiração por você, profissional e pessoalmente. Obrigada por tudo, especialmente pelos conselhos, palavras de apoio, e amizade. Obrigada por ser esse exemplo incrível de cientista dedicada e proativa, ao mesmo tempo fiel a seus princípios e à família. O mundo certamente seria um lugar muito melhor se existissem mais pessoas (e cientistas) como você.

Aos meus pais, que sempre sonharam comigo, me apoiando de todas as formas possíveis ao longo dessa caminhada. Juntos superamos a saudade e a distância, as pedras no caminho (e nos rins), e os momentos difíceis. Obrigada por serem tão incríveis e por sempre acreditarem em mim, mesmo quando nem eu mesma acreditei. Amo muito vocês!

Aos meus amigos e amigas de longa data, que tornaram essa caminhada mais leve e feliz. Por inúmeras vezes, vocês transformaram as lágrimas em risadas, o desânimo em força para continuar, os dias pesados em noites alegres (as de karaokê melhores ainda). Se tornaram uma família paralela, que me acolheu, ouviu e apoiou. Carol Esposa, João Victor, Pin, Ricardo, Mi, Bibu, Patty, Helon e Laís vocês são os melhores amigos que eu poderia ter nessa vida. À Carol e João, um agradecimento especial por constituírem comigo a pensão da Tia Ruiva, nosso lar em Campinas.

Aos meus amigos e colegas do Metropoly, que tornaram a vida mais leve e me ouviram sempre que precisei. Pelas risadas, conselhos, estórias de vida, lanches e abraços. Um agradecimento especial ao Devit, ao Havner, à Débora e ao André (que um dia será o melhor psicólogo deste Brasil).

Ao Arthur, ao Felipe e ao Matheus, que entraram em minha vida de forma inusitada na reta final do mestrado, mas que em tão pouco tempo passaram a representar e me apoiar tanto. Obrigada por todas as palavras de carinho e incentivo, e por me ouvirem e acalentarem sempre que precisei. Ao Arthur pelos conselhos sem floreios e conversas nerds. Ao Felipe, um agradecimento especial por me ajudar a ter

equilíbrio (tanto andando de bike, quanto na vida), e pelas contribuições na trilha sonora da escrita desta dissertação (ora como playlists, ora como performances no piano). Ao Matheus, pelas noites de cantoria, papos nerds e otakus, ajuda em questões computacionais e companhia durante a escrita.

Ao Ícaro, uma das pessoas mais importantes da minha vida, que viveu cada etapa ao meu lado, me apoiando, consolando e não me deixando desistir. Em cada página dessa dissertação, tem um pouquinho de você, que me abraçou, ajudou, alimentou e acalentou, em cada crise e em cada fase, nos dias bons, e especialmente nos ruins. Obrigada por tudo!

À Sandra, Manoel e Pedro, a família que ganhei depois de crescida, mas que compartilhou tanto comigo. Obrigada pelo apoio, carinho e momentos especiais. Vocês são um verdadeiro presente, e tornaram cada etapa até aqui mais feliz e leve.

À Luiza e Carol, por serem os melhores irmãos do mundo, por me fazerem rir (muito) com suas histórias e memes, por me consolarem e compartilharem comigo as alegrias e angústias da vida. Seja lá o que a vida nos reservar, sei que posso contar com vocês para o que der e vier.

Aos alunos e alunas das turmas de monitoria que tive o privilégio de ser PED e PAD ao longo desses sete anos de UNICAMP. Vocês me ensinaram muito sobre esse caminho complexo, porém belo e gratificante que é a sala de aula. Obrigada pelas palavras de carinho, risadas e apoio. Agradeço em especial, aos que se tornaram meus amigos, e por me fazerem lembrar que não precisamos de muito para ser feliz.

Aos professores Dr. Cláudio C. Werneck e Dr. Eduardo Galembeck, pelas oportunidades na área de ensino de bioquímica, totalizando nove monitorias, duas UPAs, inúmeras caronas, conselhos de vida e uma banca incrível de qualificação. Graças a vocês, descobri um propósito de vida e um caminho a seguir em meio a tantas incertezas.

À todos, minha eterna e mais sincera gratidão!

RESUMO

A esquizofrenia é um distúrbio psiquiátrico grave e incurável, que afeta milhões de pessoas em todo o mundo, gera grandes despesas em saúde e priva os pacientes do bem-estar e funcionalidade. A hipótese mais aceita para a origem dessa desordem propõe que alterações em vários genes de risco, interajam com estímulos ambientais, impactando no neurodesenvolvimento e na função cerebral. O diagnóstico é somente clínico e o tratamento consiste em intervenções psicossociais e no uso de antipsicóticos, que possuem notáveis efeitos colaterais. A elucidação da fisiopatologia do distúrbio e o desenvolvimento de tratamentos mais eficazes são os principais desafios no contexto da esquizofrenia. Neste contexto, estudos proteômicos associam o desenvolvimento e estabelecimento dessa desordem mental à disfunções nos sistemas neurotransmissores e nos oligodendrócitos, células mielinizantes do sistema nervoso central (SNC). No presente projeto, cultivou-se uma linhagem celular de oligodendrócitos humanos (células MO3.13) em associação com fatores solúveis no meio de cultura, visando estimular a maturação dessas células. Os oligodendrócitos foram submetidos ao tratamento com: haloperidol (antipsicótico típico), clozapina (antipsicótico atípico) e clozapina + D-serina, com posterior caracterização de seus proteomas, por proteômica shotgun. As proteínas comuns aos tratamentos estão relacionadas à ubiquitinação, degradação pelo proteassomo, metabolismo de lipídios, e reparo de danos ao DNA. Os tratamentos com clozapina e haloperidol também modularam proteínas envolvidas no citoesqueleto de actina e sinalização por EIF2, processos alterados na esquizofrenia. O tratamento com haloperidol modulou, dentre outras, proteínas envolvidas na síntese de selenocisteína e a sinalização por Rho-GTPases. Já o tratamento com clozapina modulou proteínas relacionadas à resposta celular ao estresse, organização ou biogênese de componentes celulares, conjugação à ubiquitina e proteínas *heat-shock*. Ainda, a supra-regulação da cistationina- β -sintase (CBS), importante no metabolismo de homocisteína, pode estar envolvida na melhora dos sintomas relacionada à administração de D-serina em conjunto com clozapina. Nesse contexto, o presente estudo buscou contribuir para o entendimento dos mecanismos bioquímicos moleculares envolvidos na ação dessas drogas utilizadas no tratamento da esquizofrenia, através da integração das vias bioquímicas, bem como para a identificação de moléculas-chave envolvidas na ação desses medicamentos nos oligodendrócitos.

ABSTRACT

Schizophrenia is a serious and incurable psychiatric illness that affects millions of people around the world, generates large expenditures on health and deprives patients of well-being and functionality. The most accepted hypothesis for the origin of this debilitating condition proposes that changes in several risk genes interact with environmental stimuli, affecting brain development and function. The diagnosis is only clinical, and treatment is based on psychosocial interventions and on the use of antipsychotics, which have detrimental side effects. The elucidation of the pathophysiology of the disorder and the development of more effective treatments are the main challenges in the context of schizophrenia. Consequently, proteomic studies have associated the development and establishment of this mental disorder with dysfunctions in neurotransmitter systems and oligodendrocytes, the cells responsible for myelination in the CNS. In this project, we cultivated a cell line of human oligodendrocytes (MO3.13 cells) in a culture medium with soluble factors, which stimulate the maturation of these cells. The oligodendrocytes were treated with haloperidol (typical antipsychotic), clozapine (atypical antipsychotic), and clozapine + D-serine, with posterior characterization of their proteomes by shotgun proteomics. Proteins common to haloperidol, clozapine and clozapine + D-serine treatments are related to ubiquitination, proteasome degradation, lipid metabolism, and repair of DNA damage. Clozapine and haloperidol also modulated proteins involved in the actin cytoskeleton and EIF2 signaling. Haloperidol treatment modulated, among others, proteins involved in the synthesis of selenocysteine and Rho-GTPase signaling. Moreover, clozapine treatment modulated proteins related to cellular response to stress, organization or biogenesis of cellular components, conjugation to ubiquitin, and heat-shock proteins. Furthermore, up-regulation of cystathionine- β -synthase (CBS), an enzyme important in the metabolism of homocysteine, may be involved in the improvement of symptoms related to the administration of D-serine with clozapine. In this context, this study aims to contribute to the understanding of the molecular mechanisms involved with the action of these drugs through the integration of biochemical pathways, as well as the identification of key molecules involved with their effects on the oligodendrocytes.

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1: Esquema geral dos principais componentes do Synapt G2-Si HDMS, incluindo: a fonte de ionização (ESI); os analisadores de massa (quadrupolo e TOF); e a cela de mobilidade iônica (constituída pela trap, pela câmara de mobilidade e pela transfer).

Figura 2: Etapas experimentais da cultura celular às análises de biologia de sistemas *in silico*.

CAPÍTULO 1

Figure 1: a) Neubauer chamber grid. In this case, it is important to count the four big squares, numbered from 1 to 4. b) Cells touching the left and upper limits should be considered (red cells), while those touching the right and lower limits should not be counted (blue cells).

Figure 2: MO3.13 cell culture. On the left, cells in the conventional culture medium (DMEM, 10% FBS and 0.1% penicillin/streptomycin). On the right, cells after 15 days in maturation medium: DMEM, 0.5% N2, 0.5% B27, 0.1% penicillin/streptomycin, 10 ng/mL of PDGF α and 30 ng/mL of T3.

Figura 5: Cultura de MO3.13 em processo de maturação (cultivo em DMEM, contendo 0.5% N2, 0.5% B27, 0.1% penicilina/ estreptomicina, 10 ng/mL de PDGF α e 30 ng/mL de T3), nos dias 03, 06 e 09; em comparação com controle (cultivo em DMEM, 10% soro fetal bovino e 0.1% penicilina/ estreptomicina).

Figura 6: Células MO3.13 maturadas, marcadas com anticorpos anti-PLP (parte superior) e anti-PDGFR α (parte inferior), além do controle sem anticorpo secundário. Escala: 100 μ m.

Figura 7: Células MO3.13 maturadas, marcadas com anticorpos anti-PLP (esquerda) e anti-CNPase (direita). Escala: 200 μ m.

CAPÍTULO 2

Figura 8: Diagrama de Venn do número de proteínas diferencialmente reguladas em MO3.13 maturadas tratadas com haloperidol, clozapina e clozapina com D-serina.

Figura 9: Proteínas diferencialmente reguladas comuns às MO3.13 maturadas tratadas com haloperidol, clozapina e clozapina + D-serina. As interações entre elas estão representadas por linhas conectando os nódulos. Quanto mais escura a linha, maior o grau de confiança a respeito da interação, calculado a partir de evidências encontradas na literatura e bancos de dados.

Figura 10: Vias canônicas moduladas pelos tratamentos com haloperidol e com clozapina. As vias em tons de vermelho estão previstamente supra-reguladas, enquanto as em tons de azul previstamente infra-reguladas.

Figura 11: Processos biológicos nas quais as proteínas diferencialmente reguladas pelo tratamento com haloperidol estão envolvidas em MO3.13 maturadas (em comparação com o veículo).

Figura 12: Processos biológicos nas quais as proteínas diferencialmente reguladas pelo tratamento com clozapina estão envolvidas em MO3.13 maturadas (em comparação com o veículo).

Figura 13: Interactoma das proteínas diferencialmente reguladas pelo tratamento com clozapina, em comparação com veículo. As coloridas em azul escuro estão envolvidas na organização ou biogênese de componentes celulares. As em amarelo participam do guidance axonal. As em rosa no metabolismo de mRNA. As em vermelho no metabolismo celular e as em azul claro na conjugação à ubiquitina. As interações entre elas estão representadas por linhas conectando os nódulos.

Figura 14: Interactoma das proteínas diferencialmente reguladas exclusivamente pelo tratamento com clozapina. As coloridas em azul escuro estão envolvidas no metabolismo de mRNA. As em vermelho na organização ou biogênese de componentes celulares, e as em verde no metabolismo de proteínas celulares. As

interações entre elas estão representadas por linhas conectando os nódulos. Quanto mais escura a linha, maior o grau de confiança a respeito da interação, calculado a partir de evidências encontradas na literatura e bancos de dados.

Figura 15: Processos biológicos nas quais as proteínas diferencialmente reguladas pelo tratamento com clozapina + D-serina estão envolvidas em MO3.13 maturadas (em comparação com o veículo).

Figura 16: Interactoma das proteínas diferencialmente reguladas pelo tratamento com clozapina + D-serina, em comparação como veículo, em MO3.13 maturadas. As coloridas em vermelho estão associadas à organização ou biogênese de componentes celulares (especialmente organelas, como os ribossomos). As coloridas em rosa participam de processos metabólicos, tanto catabólicos quanto anabólicos. As em azul ao metabolismo de compostos nitrogenados, e as em verde a organização de organelas. As interações entre elas estão representadas por linhas conectando os nódulos. Quanto mais escura a linha, maior o grau de confiança a respeito da interação, calculado a partir de evidências encontradas na literatura e bancos de dados.

ANEXO: ARTIGO DE REVISÃO

Figure 1. An overview of the components endocannabinoid system. Legend: anandamide (AEA), 2-arachidonoylglycerol (2-AG), fatty acid amide hidrolase (FAAH), monoacylglycerol lipase (MAGL), N-acyl-phosphatidylethanolamine-phospholipase (NAPE), diacylglycerol lipase alpha (DAGL α) and beta (DAGL β), α,β -Hydrolase-domain-containing protein 6 and 12 (ABHD6 and ABHD12), α,β -hydrolase domain-containing protein 4 (ABHD4), N-acylethanolamine-hydrolyzing acid amidase (NAAA), and type 1 (CB1) and 2 (CB2) cannabinoid receptors.

Figure 2. An overview of the endocannabinoid signaling. Endocannabinoids are synthesized upon demand at postsynaptic neurons and act as retrograde. After this, the endocannabinoids are removed rapidly from synapses by transporters at neuronal membranes. On the post-synaptic side, 2-AG can be hydrolyzed into glycerol and AA

by the enzyme ABHD6, embedded in the membrane. On the pre-synaptic side, 2-AG can be broken down by MAGL, loosely associated with the plasma membrane, or by ABHD12, a transmembrane protein. On the other hand, AEA is hydrolyzed by FAAH, an integral membrane enzyme, located at intracellular membranes of postsynaptic somata and dendrites.

Figure 3. *In silico* analysis of proteins of the endocannabinoid system and those modulated by THC in normal rats and Nrg1-HET. A and B evidence the role of NAPEPLD in the endocannabinoid system. C: THC-modulated proteins, suggesting the pivotal role of PARK7.

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Anticorpos primários utilizados para imunocitoquímica.

Tabela 2: Número de proteínas diferencialmente reguladas por cada tratamento, em células MO3.13 maturadas (em comparação com o veículo).

Tabela 3: proteínas relacionadas ao sistema UPS, moduladas pelos tratamentos com haloperidol, clozapina e clozapina + D-serina.

Tabela 4: Proteínas moduladas pelo tratamento com haloperidol relacionadas à sinalização por EIF2.

Tabela 5: Proteínas moduladas pelo tratamento com clozapina relacionadas à sinalização por EIF2.

Tabela 6: Proteínas moduladas pelo tratamento com haloperidol relacionadas ao citoesqueleto de actina.

Tabela 7: Proteínas moduladas pelo tratamento com clozapina relacionadas ao citoesqueleto de actina.

Anexo: Artigo de Revisão

Table 1: Description of proteins of the endocannabinoid system

Table 2: The main information about PET studies that analyzed CB1R binding in schizophrenia patients

Table 3: Proteins differently regulated in the hippocampus of adolescent *Nrg1* HET mice, WT mice, and Wistar rats: treatment with Δ^9 -THC x treatment with vehicle

Table 4: Proteins differently regulated by CBD-treatment in animal models.

Table 5: Alterations of endocannabinoid lipids in schizophrenia compared to healthy controls.

Anexo: Tabelas Complementares

Tabela 13: Proteínas moduladas pelo tratamento com haloperidol (em comparação com o veículo).

Tabela 14: Proteínas moduladas pelo tratamento com clozapina (em comparação com o veículo).

Tabela 15: Proteínas moduladas pelo tratamento com clozapina + D-serina (em comparação com o veículo).

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1 A esquizofrenia.....	18
1.2 As bases genéticas e o efeito do ambiente.....	19
1.3 Hipóteses glutamatérgica e dopaminérgica.....	21
1.4 O papel dos oligodendrócitos e da mielina.....	24
1.5 O emprego dos antipsicóticos.....	26
1.6 O papel da D-serina.....	28
1.7 Proteômica.....	29
1.7.1 Espectrometria de massas.....	30
1.7.1.1 Analisadores de massa.....	32
1.7.1.2 Métodos de aquisição de dados.....	33
1.7.1.3 Synapt G2-Si.....	34
2. JUSTIFICATIVA.....	36
3. OBJETIVOS.....	37
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
4.1 Cultura celular, diferenciação e tratamentos.....	38
4.2 Extração e digestão do proteoma.....	39
4.3 Dessalinização e concentração de peptídeos em cartucho HLB/RP.....	39
4.4 Análise por nanoLC-ESI MS/MS, busca e processamento de dados.....	40
4.5 Análises de biologia de sistemas <i>in silico</i>	41
4.6 Imunocitoquímica.....	42
5. CAPÍTULO 1.....	44
6. CAPÍTULO 2 (RESULTADOS E DISCUSSÃO)	58
6.1 Proteômica das MO3.13 maturadas.....	58
6.1.1 Haloperidol x Veículo.....	70
6.1.2 Clozapina x Veículo.....	72
6.1.3 Clozapina + D-Serina x Veículo.....	80
7. CONCLUSÃO.....	85
8. PERSPECTIVAS.....	87
9. REFERÊNCIAS.....	88
10. ANEXOS.....	114
10.1 Artigo de Revisão.....	114
10.2 Certificados de apresentações em congressos.....	153
10.3 Tabelas Complementares.....	154
10.4 Declaração de bioética/biossegurança.....	173
10.5 Declaração de direitos autorais.....	174

1. INTRODUÇÃO

1.1. A esquizofrenia

A esquizofrenia é uma desordem psiquiátrica crônica, severa e incapacitante caracterizada por distúrbios comportamentais e funções mentais anormais, consistindo em um dos mais importantes problemas de saúde pública a nível global (Owen et al., 2016). Geralmente se manifesta por volta dos 16 a 30 anos de idade, persistindo, na maioria dos casos, por toda a vida do paciente (Mueser & McGurk, 2004). A esquizofrenia apresenta uma combinação heterogênea de sintomas, categorizados como produtivos, negativos e cognitivos (Owen et al., 2016).

Os sintomas produtivos referem-se a alterações de pensamentos, tais como perda de contato com a realidade, alucinações (falsas percepções), delírios (falsas crenças) e desordens de fala e comportamento. Por sua vez, os sintomas negativos são caracterizados por isolamento social, estagnação afetiva, anedonia (perda da capacidade de sentir prazer) e diminuição da iniciativa. Já os sintomas cognitivos correspondem a um amplo conjunto de disfunções cognitivas, tais como alterações na memória e no planejamento e execução de tarefas (Kahn et al., 2015; Owen et al., 2016).

O início do distúrbio, embora muitas vezes não seja diagnosticado como tal, é denominado fase prodrômica (antes da manifestação do primeiro episódio psicótico), e consiste em um declínio cognitivo e de funções sociais (Kahn et al., 2015; Owen et al., 2016). Geralmente começa nos anos iniciais da adolescência e precede o aparecimento dos sintomas psicóticos. Entretanto, os pacientes não são encaminhados para consultas até a manifestação de psicose no começo da vida adulta (Kahn et al., 2015).

O tratamento consiste na combinação de medicamentos antipsicóticos e intervenções psicossociais (Kahn et al., 2015; Owen et al., 2016). Apesar do tratamento farmacológico ser a principal abordagem, a associação com o acompanhamento psicossocial é importante na aderência ao tratamento, reabilitação e suporte aos pacientes e seus familiares. Quando efetivo, os sintomas produtivos tendem a remitir, apesar de alguns pacientes apresentarem sintomas psicóticos residuais a longo prazo (Owen et al., 2016).

Os indivíduos com esquizofrenia geralmente vivenciam debilidades graves em múltiplos domínios da vida cotidiana, incluindo a habilidade de manter relações sociais, trabalhar e viver de forma independente (Owen et al., 2016). Essas debilidades geralmente persistem, mesmo após a remissão dos sintomas psicóticos. Cerca de 2/3 das pessoas que desenvolvem o distúrbio necessitam de assistência pública a partir de sistemas de segurança social governamentais dentro de poucos anos após o início, sendo que a maioria é incapaz de retornar ao trabalho ou à escola e ter interações sociais relativamente mínimas. Dessa forma, além da angústia dos pacientes e do sofrimento de suas famílias, os custos para a sociedade são contabilizados em bilhões de dólares anuais (Andreasen, 2000; Owen et al., 2016).

Neste contexto, a elucidação da fisiopatologia do distúrbio e o desenvolvimento de tratamentos mais eficazes são os principais desafios no contexto da esquizofrenia (Owen et al., 2016), considerando sua natureza multifatorial.

1.2. As bases genéticas e o efeito do ambiente

A esquizofrenia aparentemente resulta de uma interação complexa entre fatores genéticos e ambientais que influenciam no desenvolvimento cerebral precoce, levando a um processamento anormal de informações pelo cérebro (Kahn et al., 2015; Owen et al., 2016). Estudos genéticos utilizando gêmeos, adoção e históricos familiares demonstraram que o risco para desenvolvimento da esquizofrenia é maior nos indivíduos que possuem uma relação biológica com o distúrbio. Nesse contexto, quanto mais próximo o nível da relação genética, maior a probabilidade do desenvolvimento da esquizofrenia (Lewis & Lieberman, 2000; Walker et al., 2004). Entretanto, apesar de contribuírem de forma substancial, os fatores genéticos não são os únicos envolvidos na etiologia dessa desordem (Owen et al., 2016).

Com os estudos genômicos de larga escala, foram identificados potenciais alelos de risco para o distúrbio (Owen et al., 2016). Mutações raras, variações do número de cópias (CNVs), polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) e indels (inserção ou supressão de bases no genoma) foram identificados em genes relacionados à diversas proteínas sinápticas (Hall et al., 2015), por exemplo. Além disso, também foram encontradas variações genéticas relacionadas à receptores de glutamato (Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium,

2014) e de dopamina do tipo D2 (DRD2), o principal alvo dos antipsicóticos (Owen et al., 2016).

Dentre as diversas hipóteses, a do neurodesenvolvimento (Fatemi & Folsom, 2009) supõe que a predisposição genética, associada a injúrias no início do desenvolvimento cerebral, resulta em uma conectividade defeituosa entre uma série de regiões do cérebro, como mesencéfalo, tálamo e córtex pré-frontal (Lewis & Lieberman, 2000; Kahn et al., 2015). Neste contexto, complicações na vida fetal e no nascimento, tais como, infecções no período pré-natal (Brown, 2012; Khandaker et al., 2013), estresse materno (Khashan et al., 2008), deficiências nutricionais (Brown, 2012; McGrath et al., 2010), crescimento anormal e complicações obstétricas (Brown, 2011; Cannon et al., 2003), podem contribuir para a patofisiologia, e aumentar o risco de desenvolvimento de esquizofrenia (Schmitt et al., 2014; Kahn et al., 2015; Owen et al., 2016). Além disso, adversidades na infância, como abuso físico e sexual, maus-tratos e bullying, também estão associados ao aumento do risco de desenvolvimento do distúrbio, assim como o uso persistente de drogas como anfetamina, metanfetamina, cocaína e drogas derivadas de catinonas (Kahn et al., 2015).

Muitos dos genes associados a esquizofrenia são expressos preferencialmente durante o desenvolvimento fetal, reforçando a hipótese de que o distúrbio se origina no começo da vida. Entretanto, ainda não é claro por que a esquizofrenia se manifesta como dificuldades sociais e cognitivas nas primeiras duas décadas de vida e emerge como uma síndrome psicótica profunda no começo da vida adulta. Os fatores de risco mencionados anteriormente afetam a conectividade neural e o desenvolvimento do cérebro. Desta maneira, esse circuito neural anormal é suscetível à disfunção, quando descoberto pelos processos de desenvolvimento e eventos oriundos da adolescência (como a mielinização, a poda sináptica e os efeitos hormonais da puberdade no sistema nervoso central) (Lewis & Lieberman, 2000). Sendo assim, acredita-se que alterações no panorama biológico cortical nessa fase da vida, incluindo mudanças consideráveis na organização das sinapses, podem ser um fator importante que interage com as disposições do começo do desenvolvimento (Kahn et al., 2015). A exposição a fatores de estresse na faixa etária de desenvolvimento do distúrbio também pode contribuir para o processo (Lewis & Lieberman, 2000).

Ainda, estudos post-mortem de pacientes evidenciaram alterações nos sistemas de neurotransmissores dopaminérgicos, glutamatérgicos, de GABA (γ -ácido aminobutírico), dentre outros. O desenvolvimento e manutenção da função sináptica

normal depende de diversas vias, que são afetadas por fatores ambientais ao longo do desenvolvimento cerebral. Cascatas de sinalização associadas ao estresse, especialmente aquelas envolvendo processos inflamatórios e estresse oxidativo, modulam o desenvolvimento e manutenção da conectividade sináptica. Por exemplo, a microglia, que modula a inflamação cerebral, está envolvida na manutenção e deterioração de sinapses, especialmente na poda sináptica durante a adolescência (Ji et al., 2013; Paolicelli et al., 2011; Schafer et al., 2012). Neste contexto, diversos fatores devem ser considerados no estudo da patofisiologia e etiologia da esquizofrenia.

Outros fatores que podem contribuir para a disfunção cerebral na esquizofrenia incluem a biologia anormal dos oligodendrócitos, a resposta inflamatória e alterações na expressão de genes associados à função sináptica geral (Kahn et al., 2015). Já entre as alterações cerebrais estão a redução do volume das substâncias branca e cinzenta e do volume total do cérebro, o aumento do volume ventricular, e alteração na ativação das estruturas corticais e subcorticais. Além da alteração na conectividade de regiões cerebrais, e anormalidades nas regiões chave relacionadas à socialidade (como córtex pré-frontal, junção temporoparietal e amígdala). Estas podem estar relacionadas à déficits na cognição social característicos da esquizofrenia (Kahn et al., 2015).

1.3. Hipóteses glutamatérgica e dopaminérgica

Diversas evidências sugerem que alterações nos sistemas de neurotransmissores estão envolvidas em processos neuropatológicos relacionados à manifestação dos sintomas da esquizofrenia. Dentre estes, os sistemas dopaminérgicos e glutamatérgicos são os mais estudados, com evidências envolvendo também os sistemas gabaérgico, serotoninérgico, colinérgico (Laruelle et al., 2003) e endocanabinóide (Ksir & Hart, 2016).

A primeira proposição da teoria dopaminérgica da esquizofrenia propõe que os sintomas produtivos são gerados por uma hiperatividade na via mesolímbica (Carlsson & Lindqvist, 1963). Essa hipótese baseou-se em associações entre as doses clínicas de antipsicóticos e sua capacidade de bloqueio dos receptores D2 de

dopamina, assim como nos efeitos psicogênicos de drogas estimulantes de dopamina (Laruelle et al., 2003). Posteriormente, estudos farmacológicos e de imagem também associaram a disfunção na neurotransmissão dopaminérgica à gênese de sintomas psicóticos (Howes & Murray, 2014, Laruelle et al., 2003). Ainda, déficits na estimulação do receptor D1 no córtex pré-frontal parecem contribuir para os déficits cognitivos observados nos pacientes com o distúrbio (Laruelle et al., 2003).

Além de evidências envolvendo a transmissão dopaminérgica, diversos estudos clínicos, farmacológicos e de imagem sugerem que anormalidades na neurotransmissão glutamatérgica podem ser a base de alguns dos fenômenos psicopatológicos observados na esquizofrenia, especialmente na disfunção cognitiva (Barch & Ceaser, 2012; Kantrowitz & Javitt, 2010; Moghaddam & Javitt, 2012). O glutamato é o aminoácido mais abundante do cérebro e possui um papel fundamental como um importante neurotransmissor excitatório (Hashimoto et al., 2013).

Neste contexto, o receptor ionotrópico de glutamato N-metil-D-aspartato (NMDA), envolvido na transmissão glutamatérgica, é uma peça chave na plasticidade neural do sistema nervoso central (SNC) (Harrison & Weinberger, 2004). Diversas moléculas endógenas e exógenas são capazes de modular a atividade do receptor de NMDA, se ligando a diferentes sítios do receptor, aumentando ou diminuindo sua atividade. Os efeitos da ativação deste incluem, dentre outros, o aumento na produção e liberação de BDNF via sinalização por mTOR. O aumento de BDNF, por sua vez, pode potencializar a neuroplasticidade, levando a uma maior conectividade e eficiência da rede neural, sendo importante na função cognitiva (Peyrovian et al., 2019).

Por mais de duas décadas, a fenilciclidina (PCP), a ketamina e outros antagonistas dos receptores de NMDA foram utilizados para induzir sintomas negativos, produtivos e cognitivos similares aos observados na esquizofrenia (Hu et al., 2014). Em primatas não humanos e roedores, por exemplo, os antagonistas do receptor de NMDA induziram fenótipos associados ao distúrbio, tais como prejuízos cognitivos, sociais e sensório-motores e hiperlocomoção (Lipska & Weinberger, 2000). Nesse contexto, o uso de antagonistas do receptor de NMDA fornece um bom modelo para estudo da esquizofrenia, uma vez que os mesmos não somente agravam os sintomas, como também induzem quadros análogos aos sintomas da esquizofrenia (Hashimoto et al., 2013; Paz et al., 2008).

Uma das hipóteses é que esta disfunção glutamatérgica se relaciona com a disfunção de interneurônios parvalbumina-positivos no hipocampo e córtex cerebral. Esses neurônios são sensíveis às alterações nos receptores ionotrópicos de glutamato do tipo NMDA. Disfunções nesta população celular podem contribuir para os déficits cognitivos na esquizofrenia (Uhlhaas & Singer, 2010). Ainda, os interneurônios parvalbumina-positivos *fast-spiking* são consideravelmente sensíveis ao estresse oxidativo (Behrens et al., 2007; Do et al., 2009), que, por sua vez, contribui para déficits de mielinização (Cabungcal et al., 2014; Sawa & Seidman, 2014). Tal cenário pode contribuir para a desconectividade neural associada ao distúrbio.

As interações entre os sistemas de neurotransmissão glutamatérgica e dopaminérgica podem ser relevantes na patofisiologia e tratamento da esquizofrenia. Déficits na transmissão glutamatérgica podem levar a alterações na transmissão dopaminérgica, que por sua vez, exacerbam a disfunção glutamatérgica (Laruelle et al., 2003). A administração a longo prazo de antagonistas NMDA em estudos com animais demonstrou que a disfunção da transmissão via receptores NMDA induz alterações na transmissão mediada por dopamina. Essas alterações, tais como redução na atividade mesocortical e excesso de atividade subcortical, são consistentes com as alterações propostas pela hipótese do desbalanço de dopamina na esquizofrenia (Jentsch & Roth, 1999). Ainda, o déficit cortical de dopamina e a hiperatividade subcortical podem estar relacionados a alterações persistentes na conexão sináptica, provavelmente envolvendo o córtex pré-frontal (Laruelle et al., 2003).

A ativação dos receptores de dopamina inibe a liberação de glutamato dependente de cálcio nos terminais cortico-estriados (Kim et al., 1980). Sendo assim, com o bloqueio dos receptores D2 de dopamina pela ação dos antipsicóticos, os níveis de glutamato tendem a subir. Dessa forma, esses medicamentos restauram a transmissão glutamatérgica no estriado, a habilidade do estriado de receber e processar informações corticais, e a plasticidade de processos cognitivos relacionados às experiências (Laruelle et al., 2003).

Em suma, ainda há muito o que ser investigado sobre a neurobiologia da esquizofrenia. Evidências consistentes relacionam a disfunção na neurotransmissão dopaminérgica com a gênese de sintomas psicóticos. Outras associam anormalidades na sinalização por glutamato aos sintomas negativos e cognitivos (Owen et al., 2016). Neste contexto, a relação entre anormalidades na sinalização por dopamina e a

disfunção glutamatérgica pode fornecer indícios de como a psicose e os déficits cognitivos se manifestam na esquizofrenia, e em outras desordens psiquiátricas associadas (Owen et al., 2016). Além das disfunções associadas aos sistemas de neurotransmissão e células neuronais, diversos estudos buscam compreender o papel das células gliais, tais como astrócitos e oligodendrócitos, na esquizofrenia.

1.4. O papel dos oligodendrócitos e da mielina

Os oligodendrócitos são as células responsáveis pela mielinização do SNC, envolvendo os axônios em camadas especializadas de membrana celular para formar a bainha de mielina. Esta, promove isolamento elétrico para aumentar a velocidade de condução axonal, e conseqüentemente, a velocidade de processamento neural (Xu et al., 2016). A mielina compactada provê uma alta resistência elétrica e uma baixa capacitância, fatores essenciais para a propagação de impulsos nervosos saltatórios. É constituída principalmente por lipídios (70-80% do peso seco) e por pequenas porções de proteínas, nas quais a proteína básica de mielina (MBP) e a proteína proteolipídica (PPL) são as mais abundantes (Xu et al., 2016).

A linhagem de oligodendrócitos é composta por uma série de células em desenvolvimento, que maturam progressivamente em células pós-mitóticas mielinizantes a partir de células progenitoras (OPCs). Os pró-oligodendrócitos e os oligodendrócitos imaturos e maduros são caracterizados por alterações morfológicas e expressão sequencial de marcadores estágio-específicos (como receptor tipo alfa para fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF α R), antígeno neuro-glial 2 (NG2), marcador de oligodendrócito 4 (O4), PLP e MBP). Esse processo é regulado por moléculas extrínsecas, como fatores de crescimento (PDGF, fator de crescimento de fibroblasto básico (bFGF) e neurotrofina-3), citocinas, hormônios, e alguns dos neurotransmissores clássicos (Niu et al., 2010). A enzima 2',3'-nucleotídeo cíclico 3'-fosfodiesterase (CNP), por exemplo, é expressa de forma específica pelos oligodendrócitos e tem sido utilizada como um marcador de células mielinizantes (Fang et al., 2013).

A desconectividade neural, assim como outras alterações da substância branca na esquizofrenia, parecem estar relacionados a oligodendrócitos anormais. Descobertas relacionadas à neuropatologia da substância branca incluem a

diminuição da densidade de oligodendrócitos, alterações na distribuição espacial dos mesmos e variações na morfologia dessas células (Bernstein et al., 2014). Vale ressaltar, que os oligodendrócitos expressam os genes que codificam as proteínas estruturais da mielina de forma específica e regulada (Buntinx et al., 2003). Nesse contexto, análises de expressão gênica sugerem uma desregulação de genes relacionados aos oligodendrócitos/mielina em pacientes com esquizofrenia. Ainda, estudos neuropatológicos e de neuro-imagem também encontraram anormalidades e degeneração relacionadas aos oligodendrócitos, em especial nos lobos frontal e temporal e no corpo caloso em pacientes com esquizofrenia (Zhang et al., 2012).

Nos últimos quinze anos, diversos estudos descreveram alterações significativas na composição da mielina, associadas à esquizofrenia. Algumas delas aparentam ser região específicas, enquanto outras parecem ser mais generalizadas (Bernstein et al., 2014). Tais anormalidades podem ser centrais para o entendimento dos prejuízos cognitivos na desordem em questão (Bernstein et al., 2014). Estudos também demonstram uma redução na densidade de oligodendrócitos na substância cinzenta do córtex pré-frontal, núcleo talâmico anterior e da quarta região do corno de amon do hipocampo em pacientes com esquizofrenia (Hof et al., 2003; Uranova et al., 2004; Byne et al., 2006; Vostrikov et al., 2007; Schmitt et al., 2009).

Adicionalmente, estudos post-mortem do proteoma de tecidos cerebrais de pacientes identificaram alterações em proteínas associadas aos oligodendrócitos e ao processo de mielinização, tais como transferrina, 2',3'- nucleotídeo cíclico 3'-fosfodiesterase (CNP), proteína básica de mielina (MBP), proteína proteolípídica de mielina (PLP1), glicoproteína associada a mielina (MAG) e glicoproteína de mielina de oligodendrócito (MOG) (Cassoli et al., 2015). Nesse contexto, Cassoli et al. (2015), estudou o proteoma de oligodendrócitos (células MO3.13) tratados com MK-801, um antagonista do receptor de NMDA e clozapina (antipsicótico de segunda geração). Foram verificadas alterações em proteínas associadas à comunicação celular e sinalização, metabolismo energético, crescimento e manutenção celular, metabolismo de proteínas e regulação do metabolismo de ácidos nucleicos (Cassoli et al., 2015). Várias dessas proteínas também são diferencialmente expressas no tecido cerebral de pacientes com esquizofrenia (Nascimento and Martins-de-Souza, 2015). Ainda, o tratamento com clozapina parece reverter algumas das alterações proteômicas causadas pelo tratamento com MK-801, sugerindo que tais proteínas podem estar associadas a resposta medicamentosa (Cassoli et al., 2015).

Vale ressaltar que estudos recentes sugerem que os oligodendrócitos são alvo dos antipsicóticos, o principal modo de manejo da esquizofrenia (Zhang et al., 2012; Cassoli et al., 2015). Sendo assim, o estudo da ação dessas drogas sobre os oligodendrócitos pode contribuir para o aprimoramento do tratamento e o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas no contexto da esquizofrenia.

1.5. O emprego dos antipsicóticos

Atualmente, o diagnóstico da esquizofrenia é baseado em entrevistas realizadas entre médico e paciente, envolvendo a comunicação dos sintomas subjetivos e relato da história do paciente. A categorização deste é realizada utilizando-se o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-5) ou através da Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados à Saúde (Guest et al., 2015; Owen et al., 2016). Os critérios adotados na caracterização levam em consideração os sintomas produtivos, negativos e cognitivos característicos, a duração e efeito dos mesmos em funções sociais e ocupacionais. Além de sua potencial contribuição para outras condições psiquiátricas, distúrbios de humor e problemas com abuso de drogas (Kahn et al., 2015). Sendo assim, o tratamento da esquizofrenia deve abordar sua multifatorialidade por meio da integração de drogas e tratamentos psicossociais para lidar com uma pessoa cronicamente desabilitada (Kahn et al., 2015; Owen et al., 2016).

O tratamento medicamentoso da esquizofrenia tem como objetivo reduzir a frequência e a gravidade da exacerbação psicótica, melhorar os sintomas gerais e proporcionar uma melhor qualidade de vida para o paciente. Os antipsicóticos são divididos em duas categorias: os medicamentos típicos (primeira geração), e os atípicos (segunda geração) (Owen et al., 2016). Uma propriedade farmacológica comum entre essas duas categorias de antipsicóticos é que ambos bloqueiam o receptor de dopamina D2 (Owen et al., 2016). Os antipsicóticos de primeira geração são efetivos em reduzir os sintomas produtivos. No entanto, são minimamente eficazes para os sintomas negativos e cognitivos, sendo o haloperidol um exemplo de droga típica. Ademais, possuem uma eficácia menor quando comparados aos antipsicóticos de segunda geração, e estão frequentemente associados a recidivas e menor qualidade de vida dos pacientes (Leucht et al., 2009).

O haloperidol é um antipsicótico de primeira geração comumente utilizado no tratamento da esquizofrenia. Atua de forma eficaz contra os sintomas produtivos (como psicoses, alucinações, pensamentos desordenados), provavelmente devido ao bloqueio efetivo dos receptores dopaminérgicos (incluindo receptores D2 e D3), no mesocórtex e no sistema límbico. Entretanto, apresenta um baixo efeito terapêutico sobre sintomas negativos e déficits cognitivos em pacientes com esquizofrenia, como apatia, incoerência, isolamento social, redução da atenção, memória, execução e capacidade de processamento de informações (Niu et al. 2010).

Os antipsicóticos de segunda geração, por sua vez, são mais eficazes na diminuição dos sintomas negativos, estando associados à menor ocorrência de distúrbios de movimento (Owen et al., 2016). Porém também apresentam efeitos colaterais, tais como aumento de peso e sedação (Tandon, 2011; Leucht et al., 2009), e maior risco de cardiometabólico, quando comparados aos antipsicóticos de primeira geração (Owen et al., 2016). Além de se ligarem à receptores D2, os medicamentos atípicos também afetam receptores de outros neurotransmissores, como receptores de serotonina do tipo 5HT_{2A} no caso da clozapina (Meltzer, 1982).

A clozapina constitui um antipsicótico de segunda geração que apresenta eficácia superior quando comparado a outros agentes antipsicóticos, tanto típicos quanto atípicos. Seu uso está associado a redução de sintomas negativos e do risco de suicídio (Srisurapanont et al., 2015). Além disso, esse medicamento apresenta uma menor propensão para causar distúrbios de movimento. Entretanto, o uso dessa droga também pode desencadear efeitos colaterais como convulsões, agranulocitose (diminuição ou desaparecimento dos leucócitos polimorfonucleares), ganho de peso, dislipidemia (presença de níveis elevados ou anormais de lipídios e/ou lipoproteínas no sangue) e necessidade de monitoramento constante de leucócitos (Rajkumar et al., 2011).

Apesar de efetivos no tratamento de sintomas positivos, os antipsicóticos apresentam uma eficácia limitada no tratamento de sintomas negativos e déficits cognitivos. Sendo assim, é necessário estudar e avaliar abordagens alternativas de tratamento (Insel, 2010; Javitt, 2015a). Neste contexto, a associação de co-agonistas do receptor NMDA (tais como a D-serina), ao tratamento convencional com antipsicóticos busca potencializar a redução dos sintomas, melhorando assim a qualidade de vida dos pacientes.

1.6 O papel da D-serina

A disfunção associada à NMDAr é uma das principais hipóteses para explicar a fisiopatologia da esquizofrenia, sendo a ativação dos canais de cálcio deste receptor dependente da ligação do glutamato e co-agonistas. A D-serina é um co-agonista endógeno do NMDAr que apresenta um papel modulatório importante, ao se ligar aos sítios de glicina do receptor em questão (subunidades NR1/NR2) (Cho et al., 2016). A D-serina derivada de astrócitos é importante na plasticidade sináptica do hipocampo (Cho et al., 2016), desempenhando também um papel chave na migração neuronal no cerebelo (Horn et al., 2013) e na função cognitiva, através de processos dependentes do receptor de NMDA (Nagai et al., 2012). Encontra-se distribuída principalmente no córtex pré-frontal e no hipocampo, regiões geralmente associadas à desordens psiquiátricas (Cho et al., 2016). A diminuição da disponibilidade deste aminoácido resulta em uma hipofunção do receptor de NMDA, já que a mesma atua como um co-agonista desse receptor (Cho et al., 2016).

É sintetizada pela serina racemase (SR) a partir de L-serina (Hashimoto et al., 2013; Schell, 2004; Wolosker et al., 1999), e degradada pela D-aminoácido oxidase (DAAO) (Miyoshi et al., 2011; Schell et al., 1995; Horiike et al., 1994). A L-serina é sintetizada a partir do 3-fosfoglicerato, um metabólito da glicólise, através de 3 etapas enzimáticas catalisadas pela 3-fosfoglicerato desidrogenase (PHGDH), fosfoserina aminotransferase 1 (PSAT1) e fosfoserina fosfatase (PSP) (De Koning & Klomp, 2004). Os astrócitos sintetizam L-serina, e esta é posteriormente transportada para os neurônios para ser convertida em D-serina pela serina racemase (SR), uma enzima dependente de piridoxal-5'-fosfato (Nitoker & Major, 2014), em um processo conhecido como *shuttle* de serina (Wolosker et al., 2016). A SR e a D-serina se concentram nas densidades pós-sinápticas em neurônios glutamatérgicos e gabaérgicos que expressam SR (Li et al., 2013), onde a D-serina se liga aos sítios moduladores de glicina em receptores sinápticos de NMDA, os preparando para responder ao glutamato. D-serina é então transportada para os astrócitos, onde é catabolizada pela D-aminoácido oxidase (DAAO) (Miyoshi et al., 2011).

Diversos estudos demonstraram níveis reduzidos de D-serina no soro (Hashimoto et al., 2003; Yamada et al., 2005; Calcia et al., 2012; El-Tallawy et al., 2017; Panizzutti et al., 2018) e líquido cérebro-espinhal (Bendikov et al., 2007; Hashimoto et al., 2005) de pacientes com esquizofrenia, em comparação com

os controles. Vale ressaltar que a D-serina presente no sangue pode ser originada no cérebro, e que níveis reduzidos de D-serina no soro podem ser reflexo de uma diminuição da atividade da SR no cérebro de pacientes com esquizofrenia (Yamada et al., 2005). Em contrapartida, outros estudos não encontraram diferenças significativas nesse sentido (Hons et al., 2008; Ohnuma et al., 2008; Ohnuma & Arai, 2011; Brouwer et al., 2013; Ozeki et al., 2016). Além disso, foi demonstrado um aumento na expressão da D-aminoácido oxidase (DAAO) no cérebro post-mortem de indivíduos com esquizofrenia (Verrall et al., 2007; Madeira et al., 2008; Burnet et al., 2008), e níveis significativamente aumentados de DAAO no soro de pacientes (El-Tallawy et al., 2017).

Neste contexto, níveis reduzidos de SR e/ou elevados níveis de DAAO em pacientes com esquizofrenia (Calcia et al., 2012; Bendikov et al., 2007), podem levar a níveis reduzidos de D-serina, um importante co-agonista de NMDAr. Acredita-se que a disfunção na atividade deste receptor, por sua vez, esteja envolvida na fisiopatologia do distúrbio (Cho et al., 2016; Coyle, 2006). Dessa forma, a redução dos níveis de D-serina pode contribuir para a hipofunção de NMDAr e prejudicar a plasticidade cortical em indivíduos com esquizofrenia (Kantrowitz et al., 2016), contribuindo para o agravamento dos sintomas clínicos (Cho et al., 2016). Sendo assim, estratégias de tratamento baseadas na normalização do metabolismo de D-serina podem ser importantes no contexto do distúrbio (El-Tallawy et al., 2017).

Dessa forma, a D-serina vem sendo testada como um agente terapêutico potencial para a esquizofrenia. A administração de D-serina como uma terapia adjunta, combinada a antipsicóticos atípicos, levou a melhoras em testes que avaliam sintomas negativos e cognitivos (Heresco-Levy et al., 2005; Tsai et al., 1998b; Kantrowitz et al., 2018), demonstrando ser benéfica no alívio de diversos sintomas associados à esquizofrenia (Lane et al., 2010). Ainda, foi sugerido que administração de D-serina pode ajudar na prevenção de sintomas negativos, quando administrada na fase prodrômica (Kantrowitz et al., 2015b).

1.7. Proteômica

Visto que a esquizofrenia é um distúrbio multifatorial, o estudo desta requer métodos que permitam investigar e elucidar os mecanismos moleculares envolvidos

em sua patologia (Guest et al., 2015). Na última década foram realizadas diversas análises de tecidos cerebrais *post mortem* de pacientes com esquizofrenia, utilizando técnicas como eletroforese bidimensional (2D) e espectrometria de massas shotgun. Tais estudos resultaram na identificação de alterações de proteínas envolvidas no metabolismo energético, associadas ao estresse oxidativo, estrutura neuronal e transporte, tráfego celular e transdução de sinal. As alterações encontradas, ao serem analisadas em conjunto, sugerem um efeito na perda de mielinização e função sináptica, levando a disfunção de áreas cerebrais específicas e uma comunicação perturbada entre regiões cerebrais distais (Nascimento & Martins-de-Souza, 2015).

Nesse contexto, as técnicas de proteômica podem complementar os estudos genéticos e vêm sendo utilizadas na identificação de biomarcadores e vias relacionadas à esquizofrenia, propiciando perspectivas sobre a fisiopatologia do distúrbio. Através de análises proteômicas por espectrometria de massas, é possível investigar, de maneira quantitativa, a expressão global de proteínas ou grupos de proteínas (e suas modificações pós-traducionais), em um dado momento e local, visto que esses grupos podem mudar para cada tipo de célula e situação fisiológica (Domon & Gallien, 2015; Altelaar et al., 2012). Ademais, constitui uma técnica de alto rendimento que pode detectar expressões de proteínas pouco abundantes, fornecendo um perfil preciso e funcional do estado fisiológico atual, reflexo da complexa interação do gene com o ambiente. A importância dessas interações tem aumentado na pesquisa da esquizofrenia e outras desordens neurológicas (Nascimento & Martins-de-Souza, 2015).

1.7.1. Espectrometria de massas

A análise de peptídeos por espectrometria de massas requer a ionização da amostra de forma branda e eficiente, sendo necessária uma fonte de ionização. Independente do estado inicial da amostra, esta é convertida ao estado gasoso para que seja possível analisá-la pelo espectrômetro de massas. A ionização por eletrospray (ESI) (Whitehouse et al., 1985; Fenn et al., 1989), por exemplo, ocorre por repulsão eletrostática, através da passagem do analito carregado em solução por um capilar carregado, o que irá resultar em um spray aerossol, que na presença de um gás de nebulização, irá dessolvatar a amostra (inicialmente em estado líquido),

convertendo a mesma para o estado gasoso. Posteriormente, os íons gerados pela fonte são atraídos para a região de carga negativa resultante da voltagem aplicada, sendo transportados para dentro do espectrômetro de massas. Para descrição mais detalhada do mecanismo de ESI, a revisão de Bruins (1998) pode ser consultada.

Após a produção dos íons gasosos, os mesmos são separados de acordo com sua razão massa/carga (m/z), uma propriedade física dos íons medida pelos analisadores de massa. Existem diversos tipos de analisadores, mas de forma geral, todos utilizam energia elétrica estática ou dinâmica e campos magnéticos isolados ou combinados para distinguir e separar os íons de acordo com seu comportamento, determinado por sua m/z . As diferenças entre os tipos de analisadores estão justamente na forma como esses campos são empregados na separação dos íons. Um espectrômetro de massas, além da fonte de ionização, e do(s) analisador(es), possui também um detector, responsável por detectar e amplificar a informação do analisador, gerando espectros de massas. Esse grande conjunto de dados é analisado e processado por ferramentas computacionais específicas.

Os softwares de processamento de dados utilizam espectros teóricos, produzidos a partir de bancos de dados de proteínas, para comparação com os dados experimentais, e consequente identificação dos peptídeos. Nesse processo, são considerados os sítios de clivagem da enzima utilizada no processo de digestão das proteínas. A enzima comumente utilizada é a tripsina, uma vez que a clivagem catalisada por ela ocorre depois de resíduos de lisina e arginina, garantindo pelo menos um aminoácido com cadeia lateral básica, facilitando a ionização da amostra. Também são considerados uma série de parâmetros de identificação, como redução e alquilação de cisteínas, e modificações pós traducionais (Cravatt et al., 2007). Todos esses parâmetros são utilizados para fazer a digestão *in silico* das proteínas e gerar espectros de massas teóricos. A partir da comparação entre os espectros de massas teórico e experimentais, é possível atribuir uma sequência peptídica para cada espectro experimental e com base nessa sequência de peptídeos, é possível inferir a sequência proteína, considerando seu tamanho e faixa de cobertura. Ao final, é gerada uma lista de proteínas identificadas (e quantificadas dependendo da análise), que serve como base para as análises de biologia de sistemas *in-silico* dos dados.

1.7.1.1. Analisadores de massa

O quadrupolo é um analisador composto por quatro barras de metal paralelas, nas quais são aplicadas voltagens RF e DC, responsáveis pela geração de um campo elétrico oscilatório no centro dessas barras. Quando o feixe iônico atravessa por entre essas barras, o ajuste da voltagem no quadrupolo permite a seleção de íons com m/z de interesse, uma vez que os íons diferem na estabilidade de suas trajetórias, em decorrência de sua m/z . Os potenciais se alteram em pares ao longo da análise, formando campos elétricos de polaridades inversas, com comportamento bem definido, permitindo que os íons de interesse não colidam com nenhuma das barras. Com a setagem de uma m/z específica em um dado momento, é aplicada uma voltagem específica, permitindo que o íon descreva uma trajetória estável até chegar ao detector. Neste caso, quando outros íons se chocam com as barras, são neutralizados e não atingem o detector do quadrupolo. A partir dessa configuração, é possível selecionar os íons que passarão para a próxima etapa e serão fragmentados, caso o quadrupolo esteja atuando como um “filtro de massas”. Em suma, o quadrupolo separa os íons de acordo com suas m/z , a partir da trajetória em campos elétricos oscilantes (Hoffman & Stroobant, 2007).

O analisador por tempo de voo (TOF – time of flight) (Stephens, 1946; Wiley & McLaren, 1955; Andrews et al., 2013) mede a m/z dos íons considerando o tempo de travessia (voo) dos mesmos por um tubo livre de potencial elétrico e sob vácuo. O tempo de voo está relacionado à velocidade dos íons, que por sua vez, se relaciona à sua m/z . Dados íons de m/z diferentes, com mesma energia cinética inicial, os íons de menores m/z possuem maior velocidade, portanto menor tempo de voo, chegando mais rápido ao detector. Ao correlacionar o tempo de travessia com o tamanho do tubo, é possível inferir a m/z .

Os espectrômetros de massa podem possuir mais de um analisador, possibilitando inúmeros tipos de experimentos. No caso de instrumentos do tipo Q-TOF, os íons peptídeos podem ser selecionados intactos no quadrupolo, posteriormente, passam pela câmara de colisão, onde são fragmentados a partir da colisão com um gás inerte (dissociação induzida por colisão, CID), e os fragmentos, por sua vez, são analisados pelo segundo analisador de massas, o TOF. É importante ressaltar que nesse tipo de colisão, CID, os peptídeos são fragmentados nas ligações

peptídicas, formando os íons b e y. A partir da diferença de massas entre os fragmentos b e y consecutivos, é possível obter a sequência dos peptídeos.

1.7.1.2. Métodos de aquisição de dados

Em equipamentos do tipo Q-TOF é possível fazer a aquisição de dados para proteômica de duas formas: i) aquisição dependente de dados (DDA), na qual o quadrupolo é programado para selecionar os peptídeos que sofrerão fragmentação a partir do que é eluído pela cromatografia e adquirido no espectro de MS (íons precursores) em tempo real. Ao selecionar os íons que serão fragmentados, a complexidade do espectro de MS/MS (dos íons fragmentos) é reduzida. Neste caso, o primeiro analisador é fundamental na seleção de íons a partir de determinadas características dos íons intactos, como massa, intensidade e carga, por exemplo. O espectro de MS/MS é, portanto, adquirido de forma sequencial, geralmente seguindo a ordem de intensidade dos íons precursores. Para a geração dos espectros de MS, o quadrupolo permite a passagem de todos os íons, sem seleção. Já nos ciclos de aquisição de MS/MS, o quadrupolo atua como um filtro de massa. Dessa forma, é feito o espectro de MS/MS de um precursor por vez, a partir dos dados de MS. Para identificações é um bom tipo de aquisição, mas para quantificação absoluta e relativa apresenta desvantagens, uma vez que a fragmentação pode variar entre as replicatas, caso a intensidade dos íons varie muito entre elas. Dessa forma, para quantificação, depende de uma reprodutibilidade superior entre as replicatas, o que não é tão crítico para a aquisição independente de dados (DIA).

ii) A aquisição independente de dados (DIA), que por sua vez, não depende da aquisição de dados MS para fragmentar os íons precursores. Neste caso, o quadrupolo atua como um guia de íons até a célula de colisão, não ocorrendo seleção de íons precursores para fragmentação. Os íons são fragmentados simultaneamente na câmara de colisão, gerando os espectros MS/MS de vários íons precursores misturados (denominação MSe em equipamentos da Waters Co.). A energia de colisão é alterada de forma cíclica, sendo os espectros de MS/MS (MSe) gerados nos ciclos de alta energia, e os espectros de MS nos ciclos de baixa energia (Levin et al., 2011). Para separar o que é fragmento e o que é precursor, leva-se em conta o tempo de retenção. Há maior reprodutibilidade quando comparado com DDA, mas depende

de uma cromatografia líquida eficiente e reproduzível, para evitar co-eluição e facilitar a deconvolução dos dados. Os espectros de MS/MS gerados por DIA são mais complexos, com aumento no número de peptídeos fragmentados.

O método MSe corresponde ao método de DIA da Waters, e compara intensidade dos peptídeos a partir de mapas 3D para a amostra, levando em consideração a razão m/z , o tempo de retenção e a intensidade relativa de cada pico. Depende, como mencionado anteriormente, de um sistema cromatográfico reproduzível, uma vez que o alinhamento do tempo de retenção é a base para a sobreposição dos mapas.

O método de HDMS (High Definition Mass Spectrometry), por sua vez, utiliza também a mobilidade iônica como critério de separação, separando melhor os sinais mais complexos, antes não separados em decorrência de co-eluição, permitindo uma quantificação mais precisa. Isso é possível, uma vez que peptídeos de mesma massa apresentam mobilidade iônica diferente, em decorrência de sua forma e propriedades distintas. Neste contexto, íons de menor m/z , passam mais lentamente pela câmara de mobilidade iônica, na presença de um gás de arraste. Já íons menores, atravessam a câmara mais rapidamente. Dessa forma, ocorre uma separação física dentro do espectrômetro de massas, antes que os íons cheguem ao segundo analisador. Como os íons não chegam simultaneamente, o poder de resolução é maior. Vale ressaltar que a mobilidade neste caso diz respeito aos íons precursores, e que o equipamento necessita de uma cela de mobilidade iônica para análises por HDMS.

1.7.1.3 Synapt G2-Si

O Synapt G2-Si HDMS (Waters Corp, Milford, EUA) é um espectrômetro de massas que apresenta fonte de ionização do tipo ESI e dois analisadores: um quadrupolo (Q) e um analisador TOF vertical, sendo caracterizado, portanto, como um Q-TOF. Entre o ESI e o quadrupolo há ainda uma *Step Wave*, que consiste de uma câmara capaz de separar moléculas carregadas de moléculas não carregadas, aumentando a sensibilidade da análise. Nessa câmara, os íons positivos (no caso de uma análise no modo positivo) são atraídos para um orifício superior na câmara, de forma a seguir para as demais etapas da análise, enquanto íons negativos e não

carregados continuam retos em suas trajetórias, não sendo transferidos para o quadrupolo.

O Synapt G2-Si HDMS é um equipamento capaz de realizar tanto análise do tipo DDA, quanto DIA. Além disso, apresenta uma cela de mobilidade iônica de alta eficiência (IMS), que confere mais uma dimensão para separação dos íons. Assim sendo, o *drift time* (tempo de mobilidade iônica) também pode ser considerado, permitindo análises por HDMS_e. A cela IMS (*Tri Wave*) é dividida em três partes: a trap, a câmara de mobilidade e a transfer. Primeiramente os íons são aprisionados na trap e são lançados em períodos regulares na câmara de mobilidade. Esta, por sua vez, os separa em função do *drift-time*, enquanto a transfer posteriormente conduz os íons para o analisador TOF.

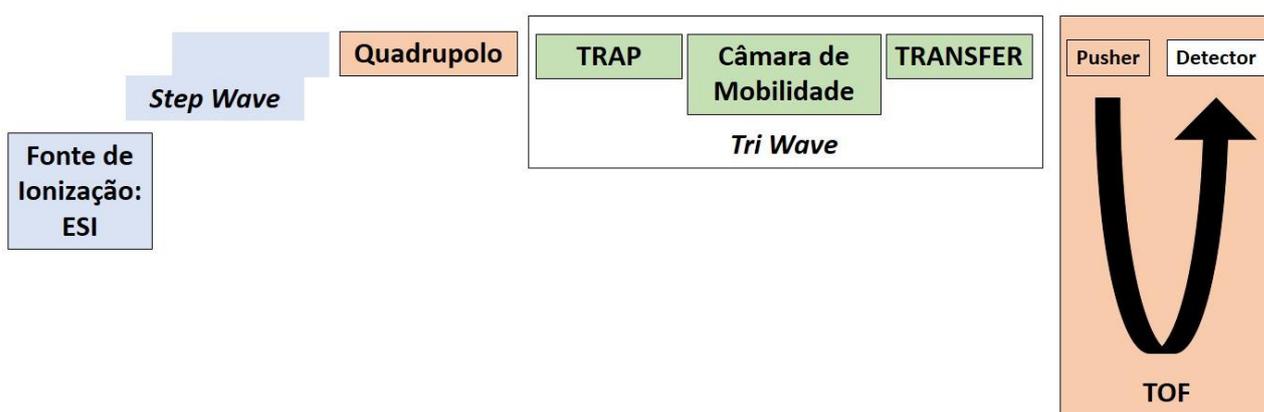


Figura 1: Esquema geral dos principais componentes do Synapt G2-Si HDMS, incluindo: a fonte de ionização (ESI); os analisadores de massa (quadrupolo e TOF); e a cela de mobilidade iônica (constituída pela trap, pela câmara de mobilidade e pela transfer).

2. JUSTIFICATIVA

A esquizofrenia é uma desordem psiquiátrica grave e atualmente incurável, que afeta milhões de pessoas em todo o mundo, gera grandes despesas em saúde e priva os pacientes do bem-estar e funcionalidade. A hipótese mais aceita para a origem da esquizofrenia propõe que alterações em vários genes de risco, interajam com estímulos ambientais, impactando no desenvolvimento e na função cerebral. Diversas metodologias, como as empregadas por transcriptômica, estudos de imagem e proteômica, têm sido utilizadas visando compreender as bases moleculares do distúrbio. Estes estudos têm associado o desenvolvimento e estabelecimento dessa desordem mental à disfunções nos sistemas neurotransmissores e nos oligodendrócitos, responsáveis pela mielinização no SNC.

Esse projeto buscou caracterizar os perfis bioquímicos, por análise de proteoma, de oligodendrócitos humanos (células MO3.13) submetidos ao tratamento com haloperidol (antipsicótico de primeira geração), clozapina (antipsicótico de segunda geração) e ao co-tratamento de clozapina + D - serina. A partir disso, identificamos as proteínas e as vias bioquímicas afetadas pelo uso desses medicamentos e suas influências sobre as funções dos oligodendrócitos. Nesse contexto, o presente estudo contribui para o entendimento dos mecanismos bioquímicos moleculares envolvidos na ação dessas drogas, através da integração das vias bioquímicas, bem como para a identificação de moléculas-chave envolvidas na ação desses medicamentos nos oligodendrócitos. Isto é relevante, uma vez que a compreensão dos mecanismos de ação dos antipsicóticos disponíveis para o tratamento da esquizofrenia é importante no desenvolvimento de tratamentos mais seguros e efetivos (Joshi & Panicker, 2018), de forma a melhorar a qualidade de vida dos pacientes.

3. OBJETIVOS

O presente projeto teve como objetivo caracterizar bioquimicamente (via análise de proteoma, por espectrometria de massas shotgun) a ação do haloperidol (antipsicótico de primeira geração, da clozapina (antipsicótico de segunda geração), e do co-tratamento de clozapina + D-serina (co-agonista endógeno do receptor NMDAr) em uma linhagem celular de oligodendrócitos humanos (células MO3.13) maturada. O estabelecimento de um protocolo de maturação dessas células também foi um objetivo deste estudo. No decorrer do projeto, os seguintes objetivos específicos foram perseguidos:

- Cultivo da linhagem celular de oligodendrócitos humanos (OLs) MO3.13;
- Diferenciação/amadurecimento das células MO3.13 utilizando fatores de crescimento específicos;
- Tratamento das células com haloperidol, clozapina e clozapina com D-serina;
- Análise do proteoma celular, por meio de nanocromatografia líquida, acoplada à espectrometria de massas;
- Análise das proteínas diferencialmente expressas, através de biologia de sistemas *in silico*;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Cultura celular, diferenciação e tratamentos

A linhagem de oligodendrócitos humanos (MO3.13) foi cultivada em meio DMEM (Sigma-Aldrich) contendo 0,5% penicilina / estreptomicina (Gibco) e 10% de soro fetal bovino (Gibco), sendo o meio renovado a cada 2 dias, como descrito previamente (Iwata et al., 2013). Para maturação, foi utilizado o meio DMEM (Sigma-Aldrich) suplementado com 0,5% de N2 (Gibco), 0,5% de B27 (Gibco), PDGF-A (10 ng/mL) (Thermo Fisher Scientific), 0,1% penicilina / estreptomicina (Gibco) e triiodotironina (T3 - 30ng/mL) (Sigma-Aldrich), a 37°C em 5% CO₂; sendo o meio renovado a cada 3 dias.

Para passagem das células, o meio de cultura foi removido com o auxílio de uma bomba a vácuo, com posterior adição de uma solução estéril de 0.25% Tripsina - EDTA para o desprendimento das células (2 mL para a garrafa de 25 cm²; 5 mL para a garrafa de 75 cm²; 2 mL para a placa de 100 mm; 1 mL para a placa de 60 mm). Foram realizados movimentos em forma de 8, com incubação a 37°C por 3 minutos. A solução de tripsina e células foi então coletada e adicionada a um tubo contendo meio de cultura suplementado (na proporção 1:3 em relação ao volume de tripsina adicionado). Os tubos foram centrifugados a 1200 RPM por 5 minutos (FANEM 206BL), e o sobrenadante foi descartado, restando o pellet celular na base do tubo. Por fim, as células foram ressuspensas e adicionadas às placas de cultura, com volumes estabelecidos a partir da contagem de células na Câmara de Neubauer.

Os oligodendrócitos foram tratados em triplicata e coletados após 8h de tratamento como se segue: 50µM Clozapina (Cristália); 50µM de Haloperidol (Cristália); 50µM de D-serina (Sigma); 50µM de solução de veículo (0.01M HCl), 50µM Clozapina + D – Serina. As células foram coletadas, com adição de PBS 1X (Sigma-Aldrich), e posterior raspagem superficial com um pequeno rodo plástico. Posteriormente, foram adicionadas a um tubo falcon de 15 mL com meio de cultura e centrifugadas a 1200 RPM por 5 min a 4°C (FANEM 206BL), com remoção do sobrenadante e congelamento dos pellets celulares a -80°C.

Os procedimentos de descongelamento, cultura, contagem, passagem, maturação e coleta de células estão descritos em maiores detalhes no capítulo 1 desta dissertação.

4.2. Extração e digestão do proteoma celular

Os precipitados celulares foram homogeneizados em 100 μ L de tampão de lise (contendo 6 M ureia (Sigma-Aldrich), 2 M tiourea (Synth), 10 mM ditioneitol (DTT) (GE Health Care Life Sciences) e 0.1 mM pervanadato de sódio) e 10 μ L inibidor de protease (Roche), vortexados e incubados por duas horas a 37°C. Após a incubação, as amostras foram diluídas dez vezes com 20 mM TEAB (Sigma-Aldrich) (tampão de bicarbonato de trietilamônio), pH 7.5 e sonicadas no gelo, em sonicador de ponta (Ultrasonic Homogenizer 4710 Series, Cole-Parmer Instrument Co.). A alquilação e digestão do proteoma foi realizada de acordo com Melo-Braga et al., 2015. Brevemente, as proteínas extraídas na etapa anterior foram alquiladas por incubação com 20 mM iodoacetamida (Amersham Biosciences), por 20 minutos ao abrigo da luz em temperatura ambiente. Para a digestão foi utilizada tripsina (*sequencing grade*) (Sigma-Aldrich / Promega) (1:50 enzima/substrato – 2% tripsina) overnight (12-16h) à 37°C. Após a incubação, foi adicionado ácido fórmico (100%) (Sigma-Aldrich) para parar a reação (concentração final 5%; incubação por 5 minutos a temperatura ambiente). Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 45 minutos a 14000 RPM a 4°C (Eppendorf – Centrifuge 5430R) para remoção dos pellets lipídicos, sendo os sobrenadantes transferidos para tubos low-binding (Axygen).

4.3. Dessalinização e concentração de peptídeos em cartucho HLB/RP

Para o processo de dessalinização das amostras de células, foi adicionado ácido trifluoroacético (TFA) 0.1 % (PerkinElmer) as mesmas, obtendo-se aproximadamente 1 mL de volume final, com ajuste de pH < 2. O cartucho HLB (Oasis - Waters) foi ativado com 1 mL de metanol 100 % (Merck), seguido por 1 mL de acetonitrila (ACN) 100 % (Merck), e equilibrado com 2 mL de TFA 0.1 % (PerkinElmer). As amostras foram adicionadas lentamente ao cartucho HLB, sendo o volume de

saída coletado e novamente adicionada ao mesmo cartucho. Em seguida, o HBL foi lavado duas vezes com 2 mL de 0.1 % TFA (PerkinElmer) e os peptídeos ligados foram eluídos em tubos Eppendorf low-binding com 2 mL de 70 % ACN / 0.1 % TFA. As amostras foram liofilizadas, e posteriormente reconstituídas em 20 mM formiato de amônio pH10. Uma alíquota foi utilizada para a determinação da concentração de peptídeos (DeNovix – DS11 Spectrophotometer). As amostras foram diluídas para uma concentração final de 1 µg/µL de peptídeo.

4.4. Análise por nanoLC-ESI MS/MS, busca e processamento de dados

As análises foram realizadas em um sistema nanoUPLC bidimensional Acquity UPLC M-Class (Waters Corporation, Milford, MA), acoplado ao espectrômetro Synapt G2-Si (Waters Corporation, Milford, MA). As aquisições dos dados foram feitas de modo multiplex dado-independente. Resumidamente, as amostras foram fracionadas por fase reversa em duas dimensões. Na primeira, os peptídeos foram separados por gradientes isocráticos descontínuos de acetonitrila e pH. Em seguida, cada grupo de peptídeos eluídos da etapa prévia foi submetido a uma nova cromatografia de fase reversa usando gradiente linear de 7 a 40% de acetonitrila. Essa cromatografia foi acoplada diretamente à fonte de ionização (por ESI) do espectrômetro de massas.

Os dados MS e MS/MS foram obtidos de maneira dado-independente utilizando mobilidade iônica, que é otimizada para cada conjunto de peptídeos eluídos do sistema cromatográfico, segundo Distler et al., 2014. As amostras foram, portanto analisadas utilizando o método de HDMS_e, com 3 fracionamentos de 54 minutos (gradientes de 13,7%, 18,4% e 50% de acetonitrila).

Os espectros de MS e MS/MS foram processados usando algoritmos dedicados em softwares de processamento e busca em bancos de dados. O ProteinLynx Global SERVER (PLGS) (Waters) foi utilizado para identificações, enquanto o Progenesis QI for Proteomics (Waters) foi empregado para realizar as análises qualitativas e quantitativas por label-free. Nesse processo, foram considerados os seguintes parâmetros: massa máxima de 600 KDa, pelo menos 2 fragmentos por peptídeo, pelo menos 5 fragmentos por proteína e pelo menos um peptídeo por proteína, com FDR < 1%. Na lista final de proteínas, foram consideradas para análise *in silico* àquelas que

apresentaram pelo menos um peptídeo único. As proteínas com valor de $p < 0.1$ no teste de Anova foram consideradas diferencialmente reguladas entre os grupos.

4.5. Análises de biologia de sistemas *in silico*

As proteínas diferencialmente expressas identificadas por shotgun foram classificadas de acordo com os processos biológicos envolvidos, e quanto à localização subcelular, utilizando bancos de dados de referência para proteínas humanas. Para a compreensão da rede de proteínas alteradas, e sua relevância para a esquizofrenia, utilizou-se o IPA (ingenuity pathway analysis - QIAGEN Bioinformatics) e softwares de análise disponíveis online tais como Reactome, String e Venny. Para tanto, considerou-se o *acession* das proteínas diferencialmente reguladas, o p-valor do teste de anova ($p < 0.1$) e o \log_2 de FC (fold change), considerando a razão entre tratamento e controle. Os dados foram agrupados em um tabela única para carregamento no IPA (QIAGEN Bioinformatics), e analisados em conjunto e individualmente para cada tratamento. Isto foi feito com o objetivo de identificar vias bioquímicas e sistemas biológicos em que as proteínas diferencialmente reguladas estão envolvidas, assim como suas redes de interação. As etapas experimentais descritas até aqui, estão representadas na figura 2.

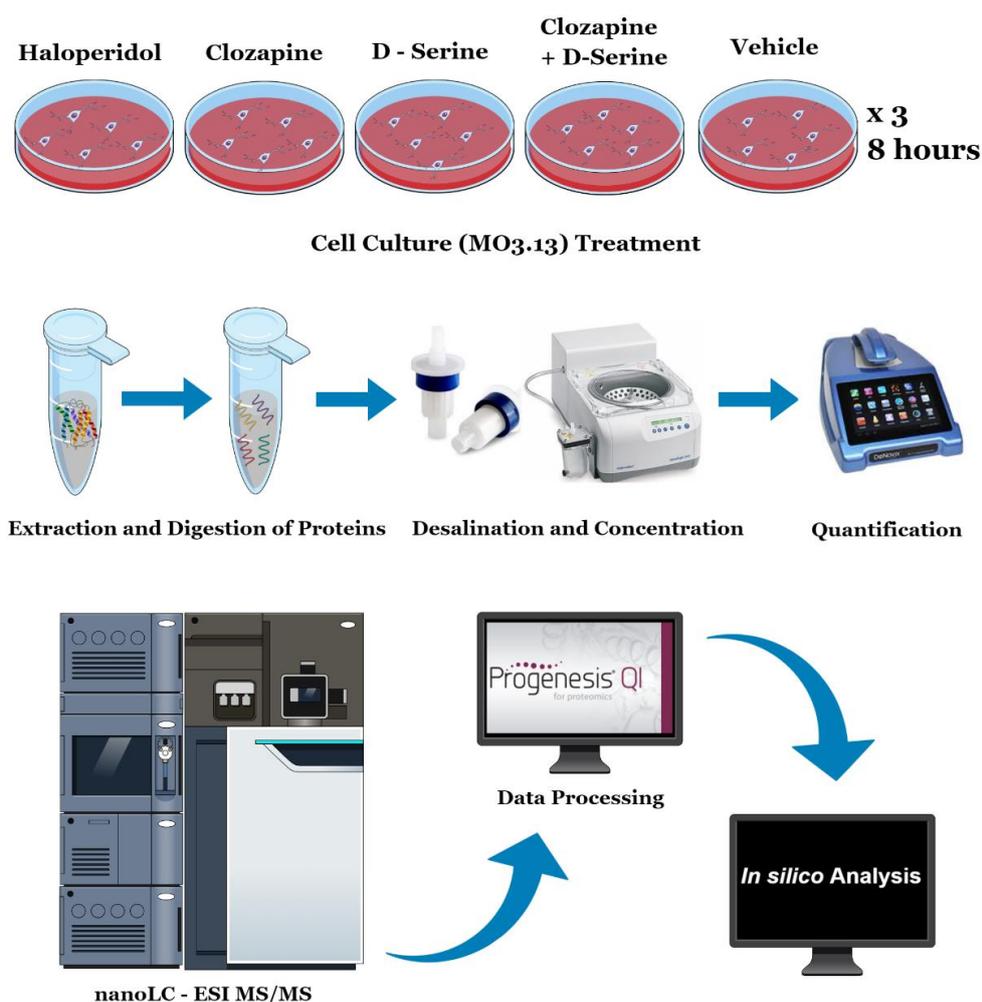


Figura 2: Etapas experimentais da cultura celular às análises de biologia de sistemas in silico.

4.6. Imunocitoquímica

As células foram cultivadas em placas de 24 poços, contendo lamínulas de vidro. Para fixação, utilizou-se 4% de paraformaldeído (PFA) (Sigma-Aldrich) em solução de PBS 1X (Sigma-Aldrich) por 20 minutos à temperatura ambiente (250 µL por poço). O PFA (Sigma-Aldrich) foi retirado, com posterior lavagem com PBS 1X (Sigma-Aldrich), por 3 vezes.

Para a manipulação das amostras em câmara úmida, foram cortados quadrantes de parafilm, sobre os quais as lamínulas contendo as células foram depositadas, com a face contendo as células voltada para cima. As lamínulas foram novamente lavadas com PBS 1X (Sigma-Aldrich), com posterior adição de glicina (Sigma-Aldrich) 0,1M por 20 minutos à temperatura ambiente. Após este período, esta

solução foi retirada e as lamínulas foram lavadas com PBS 1X (Sigma-Aldrich). Nas lamínulas a serem marcadas por CNPase (Abcam), as membranas celulares foram permeabilizadas utilizando Triton X-100 0,2% (Sigma-Aldrich) em PBS 1X (Sigma-Aldrich) por 2 minutos (Sigma-Aldrich), com posterior lavagem com PBS 1X (Sigma-Aldrich). O bloqueio foi realizado com uma solução de soro fetal bovino (SFB) 10% (Gibco) em PBS 1X (Sigma-Aldrich), com incubação por 5 minutos à temperatura ambiente.

Em seguida, as lamínulas foram incubadas com os anticorpos primários (diluição 1:400 em SFB 10% em PBS 1X) de PLP (Abcam), PDGFR α (Cell Signaling), e CNPase (Abcam). Para incubação, aplicou-se uma gota de aproximadamente 37 μ L sobre o parafilm e a lamínula foi posta por cima, com o lado das células voltado para baixo, com cuidado para evitar a formação de bolhas. A incubação com os anticorpos primários ocorreu overnight em geladeira, com posterior lavagem com PBS 1X (Sigma-Aldrich). As lamínulas foram então incubadas com os anticorpos secundários anti-mouse (Alexa Fluor™ 488 goat anti-mouse - Thermo Fisher Scientific) e anti-rabbit (Alexa Fluor™ 488 goat anti-rabbit - Thermo Fisher Scientific) (1:400 em SFB 10% em PBS 1X) e DAPI (Thermo Fisher Scientific), por 1 hora no escuro à 37°C, com posterior lavagem com PBS 1X, por 3 vezes.

Tabela 01: Anticorpos primários utilizados para imunocitoquímica.

Proteína	Fabricante	Código	Animal
CNPase	Abcam	Ab6319	Mouse (monoclonal)
PLP	Abcam	Ab28486	Rabbit (policlonal)
PDGF α R	Cell Signaling	31745	Rabbit

Para montagem das lâminas, foi adicionada uma gota de meio de montagem (Dako) nas lâminas devidamente identificadas. As lamínulas foram delicadamente colocadas sobre o líquido de montagem com a face contendo as células voltada para baixo, evitando ao máximo a formação de bolhas. As lâminas foram secas à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, com posterior leitura no Cytation 5 (BioTek). As análises foram realizadas com auxílio do Image J (National Institutes of Health, NIH).

5. CAPÍTULO 1

Seabra G., de Almeida V., Martins-de-Souza D. Maturation of a Human Oligodendrocyte Cell Line. In: Guest P. (eds) Pre-Clinical Models. *Methods in Molecular Biology*. 2019, vol 1916. Humana Press, New York, NY.

Publicado em *Methods in Molecular Biology*, volume 1916 (Pre-Clinical Models: Techniques and Protocols). 2019. Editor: Paul C. Guest.

Maturation of a human oligodendrocyte cell line

Gabriela Seabra¹, Valéria de Almeida¹, Daniel Martins-de-Souza^{1,2}

1. Laboratory of Neuroproteomics, Department of Biochemistry and Tissue Biology, Institute of Biology, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, Brazil
2. Instituto Nacional de Biomarcadores em Neuropsiquiatria (INBION) Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil

***Correspondence** dmsouza@unicamp.br

Abstract

Techniques such as the maturation and differentiation of cell lines and progenitor cells are important for the improvement and development of representative and relevant in vitro models. In this context, the following chapter proposes a maturation model of the MO3.13 cell line, aiming to contribute to a more robust and credible in vitro model of human oligodendrocytes. This may prove to be an important tool in the study of diseases related to dysfunctions in oligodendrocytes and demyelination, including schizophrenia and multiple sclerosis.

Key Words MO3.13, oligodendrocytes, maturation, T3, PDGF α , cell culture, in vitro model

1. Introduction

Oligodendrocytes (OLs) are the myelinating cells of the central nervous system (CNS), involving axons in specialized layers of cell membrane to form the myelin sheath. This structure promotes electrical insulation of the axon to increase the propagation speed of impulses, consequently enhancing neural processing (Xu et al., 2016). The oligodendrocyte lineage consists of a series of developing cells that gradually mature from oligodendrocyte progenitor cells (OPCs) into postmitotic myelinating cells (Stangel & Hartung, 2002). In this process, the cells go through a series of distinct phenotypic stages (including OPCs, pro-oligodendrocytes, immature OLs, and mature OLs) which are characterized by morphological changes and sequential expression of stage-specific markers, such as PDGFR α (platelet-derived growth factor- α receptor), neuron-gial antigen 2 (NG2), O4, proteolipid protein (PLP), and myelin basic protein (MBP), in response to differentiation signals (Stangel & Hartung, 2002). It is important to point out that the development of the OL lineage is guided by cell-extrinsic molecules, including cytokines, growth factors (bFGF, PDGF, NT3), some classic neurotransmitters, and hormones (Niu et al., 2010).

MO3.13 cells have been developed as an immortalized hybrid cell line that express phenotypic characteristics of primary oligodendrocytes, created by the fusion of human oligodendrocytes with a 6-thioguanine resistant mutant from a human rhabdomyosarcoma (cancer of skeletal muscle) by a lectin-enhanced polyethylene glycol procedure (Tebu-bio Inonovative Lab Services & Reagents, 2018). These cells present intracellular immunoreactivity to PLP and glial fibrillary acidic protein (GFAP), and surface immunoreactivity for galactosyl cerebroside (GS). MO3.13 cells also express the enzyme CNPase (2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase) and galactosylceramidase (GalC), markers of immature oligodendrocytes. Moreover, these cells can also express the mature oligodendrocytes markers MBP and myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG), under differentiation-inducing conditions (Tebu-bio Inonovative Lab Services & Reagents, 2018).

It is important to emphasize that techniques such as the maturation and differentiation of cell lines and progenitor cells are crucial to improve and develop *in vitro* models that are both representative of the original cells and practical to the scientific community. In this context, the following chapter proposes a maturation model of the MO3.13 cell line, aiming to contribute to a more robust and credible model

of human oligodendrocytes. This may be a valuable tool for the study of diseases related to dysfunctions in oligodendrocytes or demyelination, for instance schizophrenia (Miyata et al., 2015) and multiple sclerosis (Lubetzki & Stankoff, 2014)

2. Materials

1. Culture medium: Dulbecco's modified eagle medium (DMEM), 10% fetal bovine serum (FBS), 0.1% penicillin/streptomycin (see Note 1).
2. Basal maturation medium: DMEM, 0.5% N2, 0.5% B27, 0.1% penicillin/streptomycin.
3. Platelet-derived growth factor alpha (PDGF α).
4. Triiodothyronine (T3).
5. Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS) 1X: dilute sterile Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS) 10X (stored at room temperature) in autoclaved MilliQ water 1:10 in the laminar flow hood (see Note 2).
6. 0.25% trypsin-EDTA solution.
7. 70% ethanol.
8. Laminar flow hood.
9. Incubator set at 37°C with 5% CO₂.
10. Light microscope.

3. Methods (see Note 3)

3.1 Thawing

1. Clean the laminar flow with 70% ethanol, spraying it liberally over surfaces and wipe clean with a paper towel.
2. Thereafter, turn on the UV light for 15 min.
3. Meanwhile, warm the culture medium in a 37°C water bath.
4. Carefully remove the cryovial from liquid nitrogen.
5. Unscrew the cryovial cap just enough to break the seal to allow any pressure to escape when heating the vial.
6. Then, thaw it quickly in a 37°C water bath, continually stirring it with figure-8 movements.

7. In the laminar flow hood, pipet the content of the vial into a falcon tube containing 6 mL culture medium, using a pasteur pipette.
8. Wash the cryovial walls with medium from the falcon tube and return it to the falcon tube.
9. After that, gently mix by inverting the tube (see Note 4).
10. Centrifuge at 200 x g for 5 min.
11. Discard the supernatant ensuring that the cell pellet remains at the base of the tube.
12. Slowly resuspend the pellet in 1-2mL culture medium.
13. Pipette the cells into the labeled culture plates (date, cell identification; passage and name) (see Note 5).
14. Complete to the appropriate volume of culture medium (5 mL in a 25 cm² flask, 20 mL in a 75 cm² flask, 2 mL in a 6 well plate, 3.5 mL in a 60 mm plate, or 9mL in a 100 mm plate).
15. Make delicate figure-8 movements to evenly spread the cells across the plate.
16. Incubate at 37°C under 5% CO₂.
17. Clean the laminar flow hood with 70% ethanol, spraying it liberally over surfaces and wipe clean with a paper towel.
18. Thereafter, turn on the UV light for 15 min.
19. Dispose liquid and solid biohazards wastes properly.
20. Add hypochlorite and leave for at least 30 min before discarding into a biohazard receptacle.
21. Change the culture medium after 24 h to remove dead cells.

3.2 Cell passaging (see Note 6)

1. Clean the laminar flow hood with 70% ethanol, spraying it liberally over surfaces and wipe clean with a paper towel.
2. Turn on the UV light for 15 min and warm the culture medium in a 37°C waterbath.
3. Remove the old media from cultures, using a pipette or a pump (see Note 7).
4. Add sterile 0.25% trypsin-EDTA solution (2 mL in a 25 cm² flask, 5 mL in a 75 cm² flask, 2 mL in a 100 mm plate, 1 mL in a 60 mm plate), to detach the cells (see Note 8).

5. Stir the plate / flask with figure-8 movements.
6. Incubate at 37°C for 3 min.
7. Check if the cells have separated from the growth surface under the microscope (the cells will be in suspension).
8. If cells have not detached, add more trypsin and incubate for an additional 2 min at 37°C.
9. Pipette the trypsinized-cell solution into a falcon tube containing 10 mL culture medium supplemented, gently washing the plate/flask and collecting the wash into the same tube.
10. Gently wash the plate/flask with 2 mL culture medium from the falcon tube and collect the washout in order to recover more cells.
11. Using the microscope, confirm that there are no/few cells are left on the plate/flask.
12. Centrifuge the collection tube at 200 x g for 5 min.
13. Discard the supernatant ensuring that the pellet remains at the base of the tube.
14. Resuspend cells in 1 mL basal maturation medium.
15. Count the cells as described below.
16. Add 5000 cells per well to a 6 well plate, containing 1.5 mL of maturation culture medium per well.
17. First, add the basal maturation medium to the wells.
18. Thereafter, add 10 ng/mL PDGF α and 30 ng/mL T3 to each well (if using a 60 mm plate, use 3.5mL of culture medium and 8000 cells, following the same procedure) (see Note 9).
19. Gently spread the cells with figure-8 movements.
20. Incubate at 37°C under 5% CO₂.
21. Clean the laminar flow hood with 70% ethanol, spraying it liberally over surfaces and wipe clean with a paper towel.
22. Thereafter, turn on the UV light for 15 min.
23. Dispose liquid and solid biohazards wastes properly.
24. Add hypochlorite and leave for at least 30 min before discarding into a biohazard receptacle.

3.3 Cell Count

1. Clean the Neubauer chamber and the glass cover with 70% ethanol and wipe clean with a paper towel.
2. In the laminar flow hood, put the glass cover on the Neubauer chamber central area.
3. Pipette 10 μL of the solution containing culture medium and cells (when passing the cells) into the Neubauer chamber.
4. Place the tip close to the glass cover edge, at the center of the Neubauer chamber, and release the sample slowly (see Note 10).
5. Place the Neubauer chamber on the microscope and focus until you can see a sharp image of the cells.
6. Count the cells in the first big square (Fig. 1a).
7. Cells touching the left and upper limits should be considered, while those touching the right and lower limits should not be counted (Fig. 1b) (Bastidas, 2018)
8. Write down the number of cells counted in the first big square.
9. Count the remaining big squares, writing down the results from each of them.
10. Use the formula below to calculate the amount of cells in 1 mL (when counting in the big squares)) (Bastidas, 2018):

$$\text{Concentration} = (\text{number of cells} \times 10^4) / (\text{number of squares})$$

11. In case of dilution, the concentration must be divided by the dilution applied (Bastidas, 2018), as indicated below. Example: for a 1:10 dilution, dilution = 0.1.

$$\text{Concentration} = (\text{number of cells} \times 10^4) / (\text{number of squares} \times \text{dilution})$$

12. Clean the laminar flow with 70% ethanol, spraying it liberally over surfaces and wipe clean with a paper towel.
13. Thereafter, turn on the UV light for 15 min.
14. Clean the Neubauer chamber with 70% ethanol and wipe clean with a paper towel.
15. Store the chamber and the glass cover in their suitable boxes.

16. Dispose liquid and solid biohazards wastes properly.
17. Add hypochlorite and leave for at least 30 min before discarding in a biohazard receptacle.

3.4 Maturation (culture medium exchange)

1. Clean the laminar flow with 70% ethanol, spraying it liberally over surfaces and wipe clean with a paper towel.
2. Thereafter, turn on the UV light for 15 min and warm the culture medium in a 37°C waterbath.
3. Remove the old media from cultures, using a pipette or a pump. When using a pump, use disposable tips at the end of the hose. Clean the pump hose with 70% ethanol after use, to avoid microbial growth.
4. Add the basal maturation medium to the plates/wells (to a 6 well plate, use 1.5 mL per well, to a 60 mm plate use 3.5 mL).
5. Add 10 ng/mL PDGF α and 30 ng/mL T3 directly to the plate/well (see Note 9).
6. Gently spread the cells with figure-8 movements (see Note 11).
7. Clean the laminar flow hood with 70% ethanol, spraying it liberally over surfaces and wipe clean with a paper towel.
8. Thereafter, turn on the UV light for 15 min. Dispose liquid and solid biohazards wastes properly.
9. Add hypochlorite and leave for at least 30 min before discarding into a biohazard receptacle.
10. Change the culture medium every three days (see Notes 11, 12 and 13) and let mature for at least 15 days (see Note 14).

3.5 Collection of cells

1. Clean the laminar flow with 70% ethanol, spraying it liberally over surfaces and wipe clean with a paper towel.
2. Thereafter, turn on the UV light for 15 min.
3. Take all the materials needed to the culture room (see Note 15).
4. Remove the old media from cultures, using a pipette or a pump (see Note 16).

5. Add D-PBS (750 μ L/well for a 6/well plate and 2 mL for a 60 mm plate).
6. Scrape cells gently from the bottom of the plate/well, using a scraper (see Note 17).
7. Transfer the solution of D-PBS/cells to a 15 mL falcon tube (60 mm plate) or a 1.5mL microcentrifuge tube (6 well plate) and leave on ice.
8. Wash the plate/well again with D-PBS (same volume used previously) to collect any residual cells.
9. Centrifuge 5 min at 200 x g to obtain the cell pellet.
10. Discard the supernatant, carefully removing the residual D-PBS.
11. Store the cell pellets at -80°C.
12. Between samples, soak the scraper in 70% ethanol and rinse in autoclaved MilliQ water to remove cellular debris, to avoid cross-contamination between samples (see Note 18).
13. Clean the laminar flow with 70% ethanol, spraying it liberally over surfaces and wipe clean with a paper towel.
14. Thereafter, turn on the UV light for 15 min.
15. Dispose liquid and solid biohazard wastes properly. Add hypochlorite and leave for at least 30 min before discarding into a biohazard receptacle.

4 Notes

1. When supplementing with fetal bovine serum, observe its appearance. This must be clear. If it is cloudy or particles are visible, it must be filtered.
2. D-PBS should not have calcium chloride and magnesium chloride, since chlorides facilitate cell binding and clumping. D-PBS without these ions should be used to wash and rinse suspended cells (Sigma-Aldrich, 2018).
3. All materials and solutions to be used in the laminar flow hood must be sterile. Spray hands and other materials (such as bottles and packaging) with 70% ethanol. Do not spray 70% ethanol on the plates or culture flasks. Always use gloves and a clean lab coat (wash weekly). Be careful to not brush the pipet/tip against anything outside of the plate/flask or culture medium bottle. If this happens, change the pipet/tip to avoid microbial contamination.

4. The freezing medium contains dimethyl sulfoxide (DMSO), an important reagent for cryopreservation. However, at room temperature, DMSO is toxic to the cells. Therefore, it is important to thaw the cells rapidly and transfer to a new medium to avoid cell losses.
5. MO3.13 cells grow on the surface of conventional tissue culture plastic, without requiring a special coating (Tebu-bio Inovative Lab Services & Reagents, 2018).
6. Cells should be passaged when ~ 90% confluence is reached.
7. When using a pump, use disposable tips at the end of the hose. Clean the pump hose with 70% ethanol after use, to avoid microbial growth.
8. Trypsin must be stored between -5°C and -20° . Do not thaw/warm it in a water bath. To thaw, just keep it at room temperature before use. It is recommended to aliquot the solution into 10 mL aliquots.
9. Keep small aliquots of T3 and PDGF α to avoid repeated freezing and thawing cycles. Avoid keeping these compounds at room temperature before adding them to the plates.
10. The liquid should enter at the chamber uniformly. Repeat the operation if bubbles are formed (Bastidas, 2018).
11. Avoid sudden movements and any rough handling of plates during maturation, in order to prevent cells from detaching.
12. Keep a photographic record of cells at each medium change.
13. As cells begin to mature, their growth rate slows. Small groups of cells also tend to form. Moreover, the cellular morphology changes, with cells presenting more membrane projections (Fig. 2).
14. It is recommended that cells in the maturation stage do not undergo passaging. With passaging, many cells die and the phenotype regresses.
15. Ice will be needed to preserve the cells (it is better to keep the ice outside the laminar flow, but close to your working area). Also, a 50mL falcon tube with autoclaved water will be necessary, along with a container of 70% ethanol in the laminar flow hood.
16. When using a pump, use disposable tips at the end of the hose. Clean the pump hose with 70% ethanol after use, in order to avoid microbial growth.
17. Be careful to not use too much pressure, because this can release plastic from the surface, contaminating the sample.

18. The scraper can be reused, if thoroughly cleaned with 70% ethanol, packed in a suitable plastic packaging, and exposed to UV light before use.

Acknowledgement

Authors thank FAPESP (Sao Paulo Research Foundation) for funding our research (grants 2013/08711-3, 2014/10068-4, and 2017/18242-1), the Serrapilheira Institute (grant number Serra-1709-16349), CNPq (The Brazilian National Council for Scientific and Technological Development, grant 302453/2017-2) and CAPES (Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel, grant 1691474).

References

1. Xu H, Zhang H, Zhang J, Huang Q, Shen Z, Wu R (2016) Evaluation of Neuron-glia Integrity by in vivo Proton Magnetic Resonance Spectroscopy: Implications for Psychiatric Disorders. *Neurosci Biobehav Rev* 71:563-577
2. Stangel M, Hartung HP (2002) Remyelinating strategies for the treatment of multiple sclerosis. *Prog. Neurobiol.* 68(5): 361–376. doi: 10.1016/S0301-0082(02)00105-3
3. Niu J, Mei F, Li N, Wang H, Li X, Kong J et al (2010) Haloperidol promotes proliferation but inhibits differentiation in rat oligodendrocyte progenitor cell cultures. *Biochem Cell Biol* 88(4):611-620
4. Tebu-bio Inonovative Lab Services & Reagents (2018) Human Oligodendrocytic (Glial) (MO3.13) Cell Line Maintenance. https://www.tebu-bio.com/Product/007CLU301P/Human_Glial_Oligodendrocytic_Hybrid_Cell_Line_MO3_13_.html. Accessed 24 Jun 2018
5. Miyata S, Hattori T, Shimizu S, Ito A, Tohyama M (2015) Disturbance of Oligodendrocyte Function Plays a Key Role in the Pathogenesis of Schizophrenia and Major Depressive Disorder. *Biomed Res Int* 2015:492367. doi: 10.1155/2015/492367
6. Lubetzki C, Stankoff B (2014) Multiple Sclerosis and Related Disorders: Volume 122 (Handbook of Clinical Neurology). Hardcover – 20 Mar 2014. Elsevier, pp 89-99. ISBN-10: 0444520015

7. Bastidas O (2018) Technical Note - Neubauer Chamber Cell Counting. <http://www.celeromics.com/en/resources/docs/Articles/Cell-counting-Neubauer-chamber.pdf>. Accessed 24 Jun 2018
8. Sigma-Aldrich (2018). www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/d8537. Accessed 25 Jun 2018.

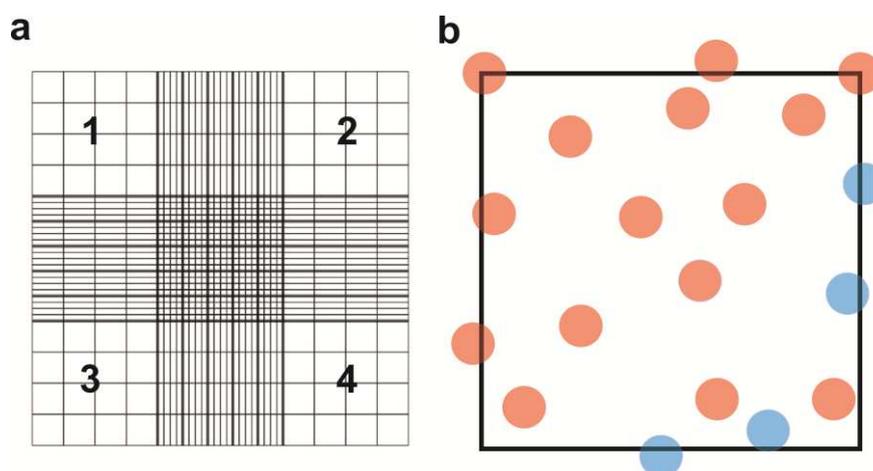


Fig. 1 a) Neubauer chamber grid. In this case, it is important to count the four big squares, numbered from 1 to 4. **b)** Cells touching the left and upper limits should be considered (red cells), while those touching the right and lower limits should not be counted (blue cells).

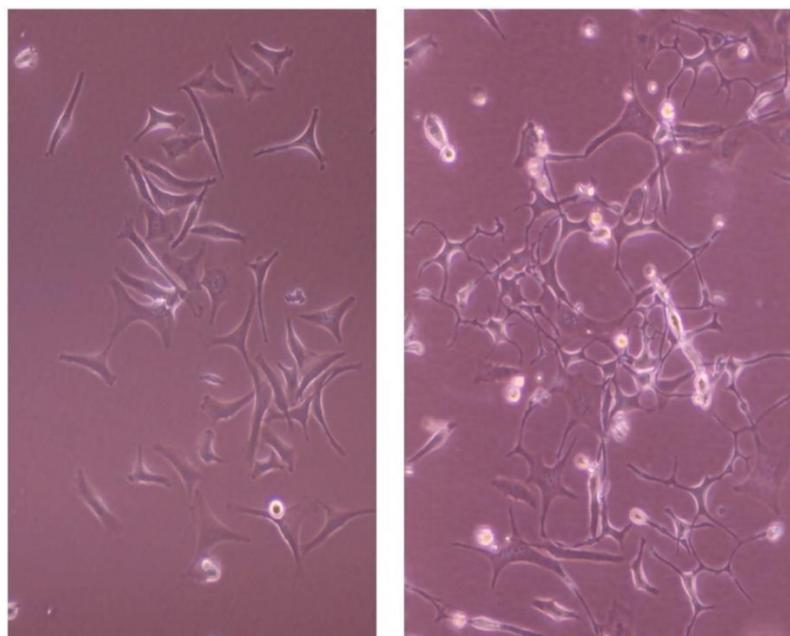


Fig. 2 MO3.13 cell culture. On the left, cells in the conventional culture medium (DMEM, 10% FBS and 0.1% penicillin/streptomycin). On the right, cells after 15 days in maturation medium: DMEM, 0.5% N2, 0.5% B27, 0.1% penicillin/streptomycin, 10 ng/mL of PDGF α and 30 ng/mL of T3.

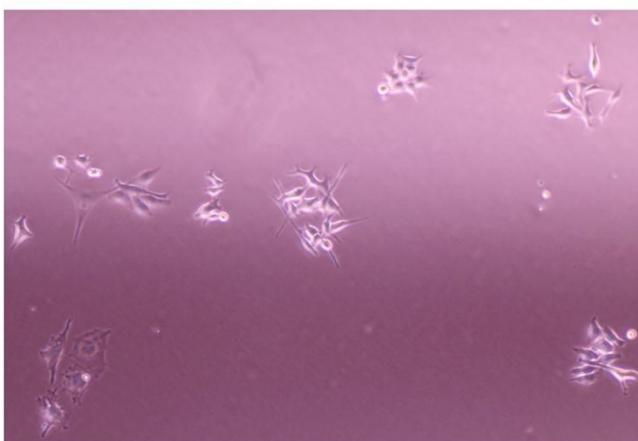
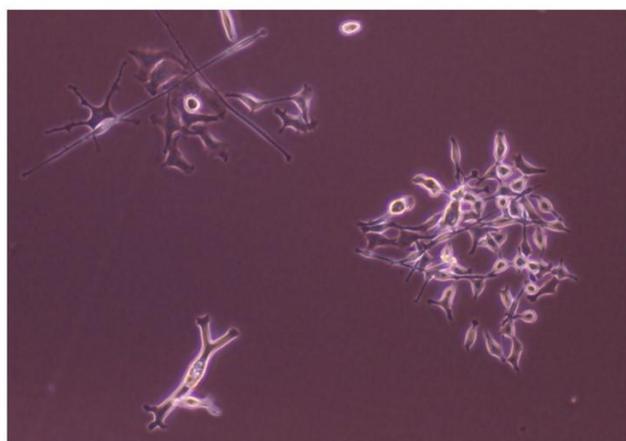
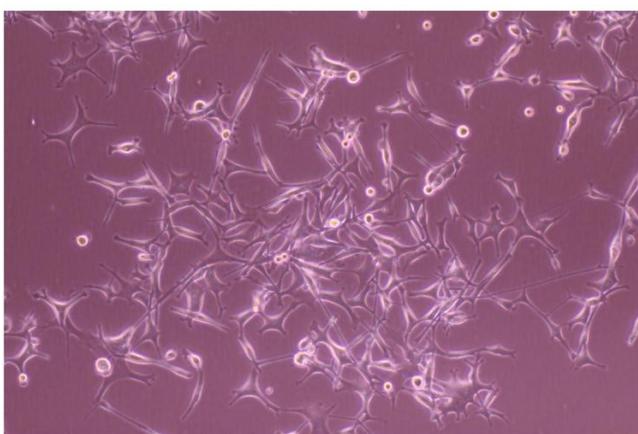
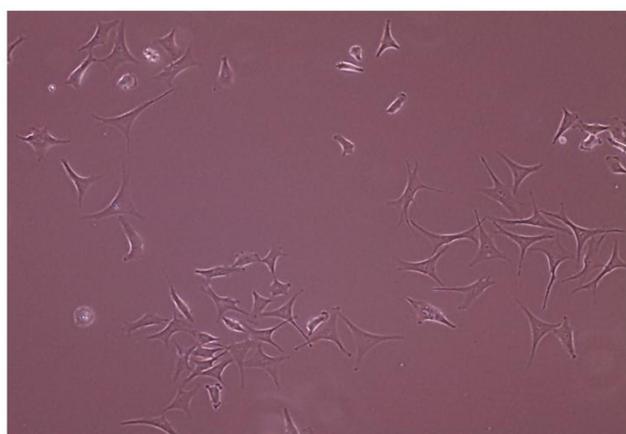
Figuras Complementares**DIA 03****DIA 06****DIA 09****CONTROLE**

Figura 5: Cultura de MO3.13 em processo de maturação (cultivo em DMEM, contendo 0.5% N2, 0.5% B27, 0.1% penicilina/ estreptomicina, 10 ng/mL de PDGF α e 30 ng/mL de T3), nos dias 03, 06 e 09; em comparação com controle (cultivo em DMEM, 10% soro fetal bovino e 0.1% penicilina/ estreptomicina).

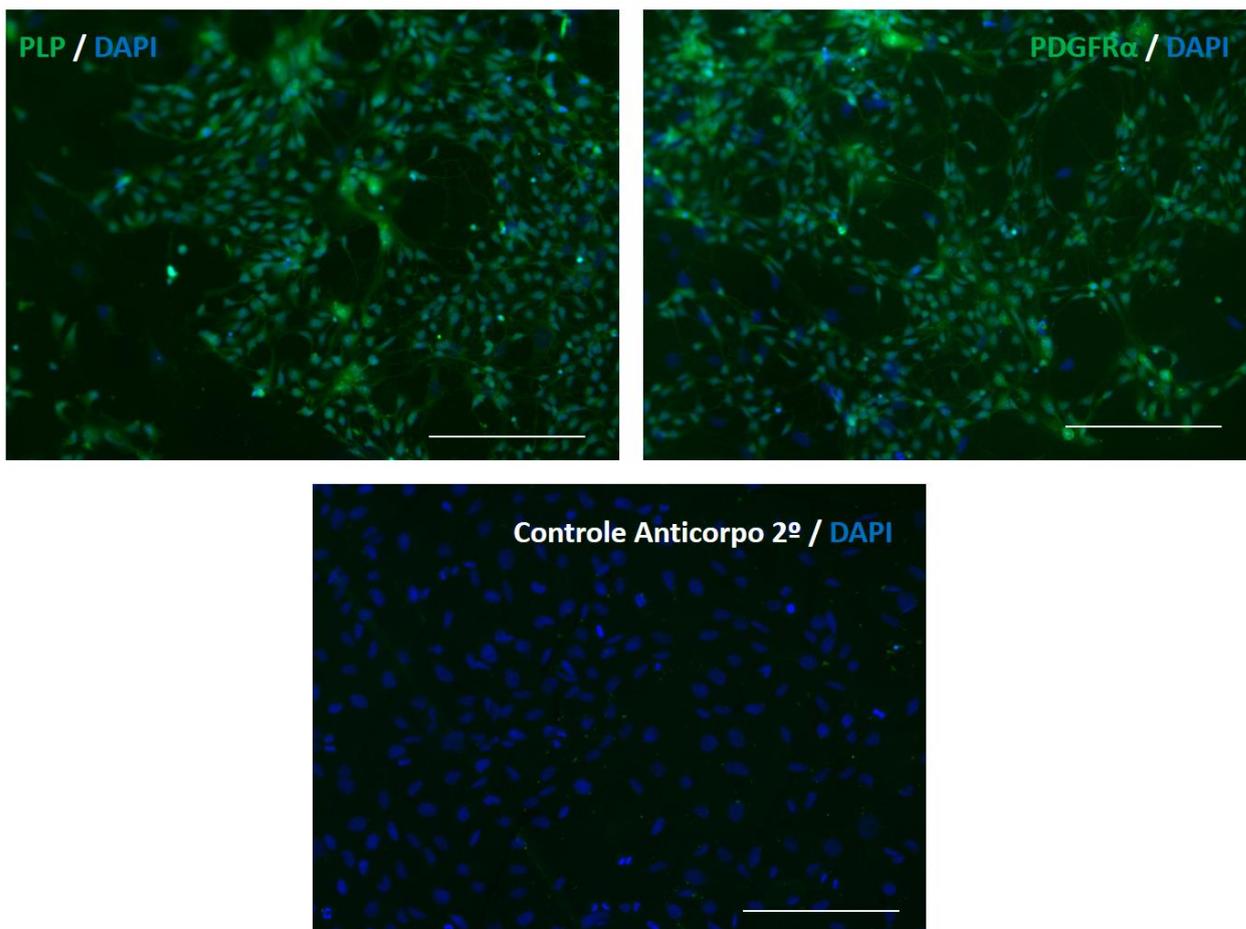


Figura 6: Células MO3.13 maturadas, marcadas com anticorpos anti-PLP (parte superior esquerda) e anti-PDGFR α (parte superior direita), além do controle sem anticorpo secundário (parte inferior). Escala: 100 μ m.

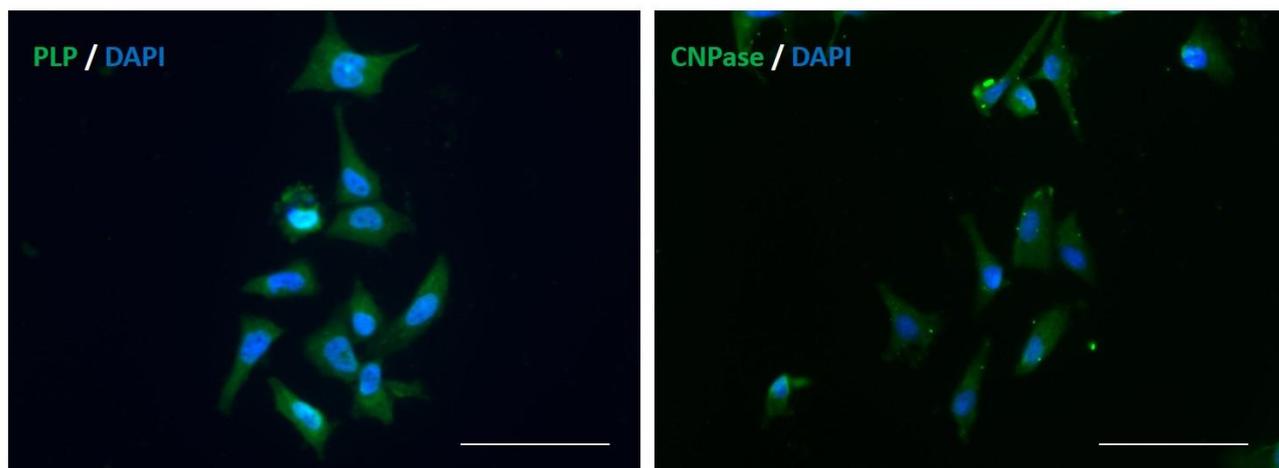


Figura 7: Células MO3.13 maturadas, marcadas com anticorpos anti-PLP (esquerda) e anti-CNPase (direita). Escala: 200 μ m.

6. CAPÍTULO 2 (RESULTADOS E DISCUSSÃO)

6.1 Proteômica das MO3.13 maturadas

Foram identificadas 1677 proteínas a partir das amostras de MO3.13 maturadas, utilizando um método de HDMS_E com três frações de 54 minutos (gradientes de 13,7%, 18,4% e 50% de acetonitrila). O número de proteínas diferencialmente reguladas, e a condição desta regulação, estão expressas na tabela 02. Para análise de biologia de sistemas *in silico* pelo IPA (ingenuity pathway analysis - QIAGEN Bioinformatics), considerou-se o *acession* das proteínas diferencialmente reguladas, o p-valor do teste de anova ($p < 0.1$) e o \log_2 de FC (fold change), considerando a razão entre tratamento e controle. Os dados foram agrupados em um tabela única para carregamento no IPA (QIAGEN Bioinformatics), e analisados em conjunto e individualmente para cada tratamento. Isto foi feito com o objetivo de identificar vias bioquímicas e sistemas biológicos em que as proteínas diferencialmente reguladas estão envolvidas, assim como suas redes de interação.

Tabela 2: Número de proteínas diferencialmente reguladas por cada tratamento, em células MO3.13 maturadas (em comparação com o veículo).

Tratamento	Diferencialmente reguladas	Supra-reguladas	Infra-reguladas
Clozapina	173	85	88
Clozapina + D-Serina	84	45	39
Haloperidol	467	318	149

Parte das proteínas diferencialmente reguladas foi comum à dois ou mais tratamentos, enquanto outras foram reguladas por apenas um dos tratamentos. Este panorama geral é representado pelo Diagrama de Venn disposto abaixo (figura 8). No total, 17 proteínas foram comuns aos tratamentos com clozapina, haloperidol e clozapina + D-serina. Estas, assim como suas interações, estão dispostas na figura 9.

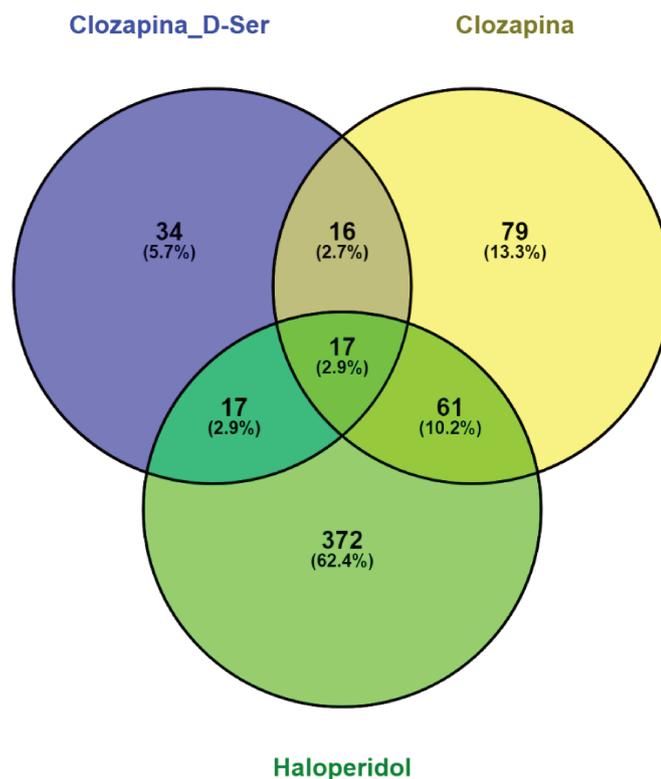


Figura 8: Diagrama de Venn do número de proteínas diferencialmente reguladas em MO3.13 maturadas tratadas com haloperidol, clozapina e clozapina com D-serina.

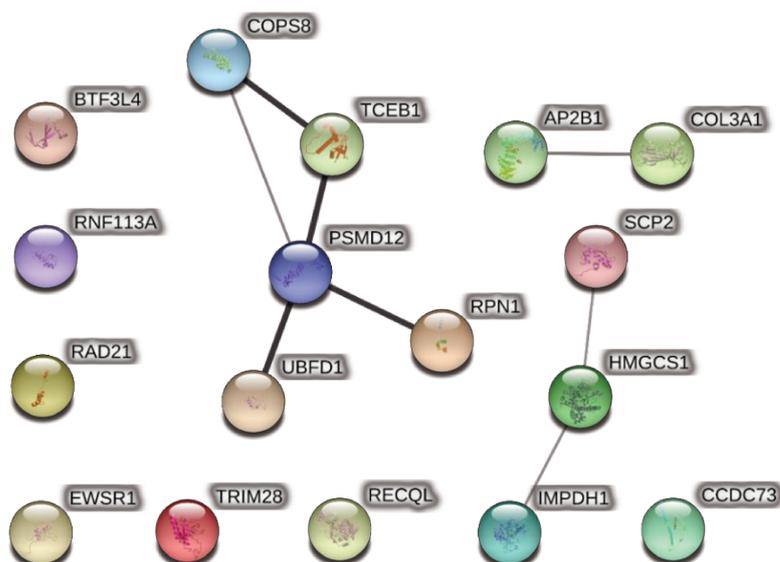


Figura 9: Proteínas diferencialmente reguladas comuns às MO3.13 maturadas tratadas com haloperidol, clozapina e clozapina + D-serina. As interações entre elas estão representadas por linhas conectando os nódulos. Quanto mais escura a linha, maior o grau de confiança a respeito da interação, calculado a partir de evidências encontradas na literatura e bancos de dados.

Dentre as proteínas moduladas pelo tratamento com haloperidol, clozapina, e clozapina com D-serina estão: PSMD12 (do inglês *26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 12*), UBF1 (do inglês *ubiquitin family domain containing 1*) e COPS8 (do inglês *COP9 signalosome complex subunit 8*), relacionadas à ubiquitinação e degradação pelo proteassomo. O sistema ubiquitina-proteassoma (UPS) desempenha um papel importante em uma série de processos celulares, tais como a marcação de proteínas para degradação, transporte por vesículas, transporte de proteínas do retículo endoplasmático para a membrana plasmática, e reciclagem de receptores de membrana (Haas & Broadie, 2008). Esses processos são importantes na regulação do ciclo, crescimento e diferenciação celular, transdução de sinal, transcrição gênica e apoptose (Kleiger & Mayor, 2014). Dessa forma, se este mecanismo tem um comprometimento funcional ou estrutural, a atividade proteolítica é comprometida, o que pode levar ao acúmulo de proteínas danificadas/disfuncionais. Isto pode contribuir para a patogênese e características fenotípicas de doenças neurodegenerativas, incluindo as doenças de Alzheimer (Checler et al., 2000) e Parkinson (Chung et al., 2001), e distúrbios associados à demência (Mayer, 2003).

Os proteassomas contribuem para aspectos da função neural que estão anormais na esquizofrenia, incluindo processos do neurodesenvolvimento, manutenção e morfologia dendrítica e homeostase energética (Santos et al., 2015; Djakovic et al., 2012; Erturkv et al., 2014; Hamilton et al., 2012; Green et al., 2011; Rajasekaran et al., 2015; Moyer et al., 2015). Outros processos relacionados ao UPS, tais como a síntese de neurotransmissores, a reciclagem de receptores e a produção e ativação de citocinas também são afetados no distúrbio. Ainda, a atividade do receptor de NMDA e a sinalização dopaminérgica, vias desreguladas na esquizofrenia, influenciam na atividade, expressão e localização dos proteassomas (Barroso-Chinea et al., 2015; Caldeira et al., 2013; Ferreira et al., 2015).

Diversas alterações no sistema UPS foram relacionadas à esquizofrenia, através de estudos envolvendo cérebros *post-mortem* de pacientes. Estes incluem: (a) níveis elevados de proteínas ubiquitinadas no córtex orbitofrontal (OFC) e eritrócitos de pacientes resistentes ao tratamento (Bousman et al., 2019); (b) diminuição de proteínas ubiquitinadas e enzimas de ubiquitinação no giro superior temporal (Scott et al., 2016); (c) infra-regulação na expressão gênica de enzimas deubiquitinantes em neurônios do hipocampo (Altar et al., 2005) e tecido do córtex pré-frontal (Middleton et al., 2002; Vawter et al., 2001); (d) redução em enzimas

conjugadoras E2 e ubiquitina ligases E3 no córtex pré frontal (Andrews et al., 2017); (e) diminuição da ubiquitinação de proteínas no giro superior temporal esquerdo, com redução nos níveis de ubiquitina livre, anormalidades em E1 ativases e E3 ligases e expressão anormal de E1 e E3 envolvidas na sumoilação e nedilação por NEDD8 (Rubio et al., 2013).

As proteínas relacionadas ao sistema UPS, moduladas pelos tratamentos com haloperidol, clozapina e clozapina + D-serina estão dispostas na tabela 3.

Tabela 3: proteínas relacionadas ao sistema UPS, moduladas pelos tratamentos com haloperidol, clozapina e clozapina + D-serina.

Símbolo	Nome (em inglês)	Haloperidol	Clozapina	Cloz. + D-Ser.
BIRC6	Baculoviral IAP repeat containing 6			
COPS8	COP9 signalosome complex subunit 8			
DNAJB11	Dnaj heat shock protein family (Hsp40) member B11			
DNAJB4	Dnaj heat shock protein family (Hsp40) member B4			
ELOC	Elongin C			
HSP90AB1	Heat shock protein 90 alpha family class B member 1			
HSPA1A/HSPA1B	Heat shock protein family A (Hsp70) member 1A/1B			
HSPA1L	Heat shock protein family A (Hsp70) member 1 like			
HSPA4L	Heat shock protein family A (Hsp70) member 4 like			
HSPA5	Heat shock protein family A (Hsp70) member 5			
HSPA9	Heat shock protein family A (Hsp70) member 9			
PSMA1	Proteasome subunit alpha 1			
PSMA3	Proteasome subunit alpha 3			
PSMA5	Proteasome subunit alpha 5			
PSMB1	Proteasome subunit beta 1			
PSMB6	Proteasome subunit beta 6			
PSMD1	Proteasome 26S subunit, non-atpase 1			
PSMD10	Proteasome 26S subunit, non-atpase 10			
PSMD12	Proteasome 26S subunit, non-atpase 12			
PSMD14	Proteasome 26S subunit, non-atpase 14			
PSMD3	Proteasome 26S subunit, non-atpase 3			
PSMD6	Proteasome 26S subunit, non-atpase 6			
PSMD9	Proteasome 26S subunit, non-atpase 9			
PSME2	Proteasome activator subunit 2			
RPS27A	Ribosomal protein s27a			
UBE2L3	Ubiquitin conjugating enzyme E2 L3			
UBE2V2	Ubiquitin conjugating enzyme E2 V2			
UBFD1	Ubiquitin family domain containing 1			
UCHL1	Ubiquitin C-terminal hydrolase L1			
USO1	USO1 vesicle transport factor			
USP14	Ubiquitin specific peptidase 14			
USP40	Ubiquitin specific peptidase 40			

Neste contexto, COPS8 é uma das subunidades do complexo do sinalossomo COP9, um complexo proteico altamente conservado que atua como um importante regulador em diversas vias de sinalização. No contexto do proteassomo, regula ubiquitina ligases E3, através de nedilação e denedilação, um processo similar a ubiquitinação, que tem como ligante a proteína NEDD8 (do *inglês neural precursor cell expressed, developmentally downregulated 8*). A nedilação por NEDD8 estimula a poli-ubiquitinação de proteínas (Rubio et al., 2013), e disfunções nesse processo já foram descritas em diversas doenças degenerativas, incluindo as doenças de Parkinson (Choo et al., 2012) e Alzheimer (Kee et al., 2012). COPS8 é uma proteína fundamental nessa regulação, atuando especialmente no processo de denedilação (Liu et al., 2015). Segundo nossos dados, é um alvo comum aos tratamentos com haloperidol, clozapina e clozapina com D-serina.

Conforme discutido, alterações no transporte e *turn-over* de proteínas, e em vias de sinalização relacionadas à ubiquitinação podem levar a anormalidades no tecido cerebral que podem contribuir para a neurotoxicidade e comprometimento funcional (Bousman et al., 2019; Scott et al., 2019). Neste contexto, elementos do sistema UPS podem atuar como potenciais alvos farmacológicos (Bousman et al., 2019). Nossos dados alinham com essa perspectiva e propõem que a modulação de proteínas envolvidas no sistema UPS é um efeito comum dos três tratamentos em questão, envolvida tanto a ação de antipsicóticos típicos, quanto atípicos.

Além disso, proteínas relacionadas ao metabolismo de lipídios também foram moduladas pelos três tratamentos, dentre elas: SCP-2 (proteína carreadora de esterol 2) e hidroximetilglutaril-CoA sintase. A SCP-2 se liga e transporta ligantes lipídicos, como ácidos graxos de cadeia longa e seus tio-ésteres CoA (Dansen et al., 1999), endocanabinóides (Martin et al., 2016), e fosfolipídios (Schroeder et al., 2003) para organelas intracelulares para armazenamento, oxidação, excreção, ou regulação de receptores (Milligan et al., 2018). Desta forma, é um componente importante na manutenção da homeostase lipídica. Já a hidroximetilglutaril-CoA sintase (ou HMG-CoA sintase) é uma enzima que catalisa a reação em que o acetil-CoA se condensa com acetoacetil-CoA para formar 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA). Este, é um intermediário tanto da síntese de colesterol, quanto da cetogênese (formação de corpos cetônicos). A forma citossólica é o ponto de partida da via do mevalonato, que leva à síntese de colesterol e outros compostos esteróides e isoprenóides. Já a forma

mitocondrial é responsável pela biossíntese de corpos cetônicos (Shimazu et al., 2010).

Os lipídios apresentam uma série de funções fisiológicas, especialmente na composição de membranas celulares, armazenamento de energia e sinalização no metabolismo celular (Leppik et al., 2019). Os fosfolipídios, em especial, são os principais componentes das membranas celulares neuronais, tendo um importante papel no crescimento e remodelamento de sinapses (Sethi et al., 2017a). Sendo assim, disfunções na síntese e degradação de lipídios podem afetar a função neural, a transmissão sináptica, a sinalização celular, a mielinização e os oligodendrócitos (Narayan et al., 2009). Isso pode contribuir para falhas no neurodesenvolvimento relacionadas à esquizofrenia (Sethi et al., 2017a; Narayan et al., 2009).

Neste contexto, diversos estudos relacionaram a esquizofrenia à anormalidades lipídicas, tais como alterações em ácidos graxos e fosfolipídios (Wang et al., 2019). Dentre estes, fosfatidilcolinas (PCs), fosfatidiletanolamina (PE) e esfingolipídios (SLs) (como a esfingomielina - SM) (Castillo et al., 2016, Misiak et al., 2017, Weber-Fahr et al., 2013; Wang et al., 2019; Leppik et al., 2019). Alterações nas substâncias branca e cinzenta do córtex pré-frontal incluem alterações nos lipídios totais, fosfolipídios, triglicerídeos e ésteres de colesterol de pacientes com esquizofrenia (Taha et al., 2013). Tais alterações podem contribuir para disfunções na substância branca e distúrbios na conectividade neural em circuitos envolvendo o córtex pré-frontal (Ghosh et al., 2017).

Além disso, foram observados níveis alterados de fosfatidilcolinas no tecido cerebral, plasma e soro sanguíneo de pacientes com esquizofrenia (Horrobin et al., 1994; Schmitt et al., 2004; Schwarz et al., 2008; He et al., 2012; Weber-Fahr et al., 2013; Ghosh et al., 2017; Aquino et al., 2018; Leppik et al., 2019). Estudos também demonstraram alterações no perfil de esfingolipídios (Fukuzako & Kodama, 1999; Matsumoto et al., 2011; Leppik et al., 2019) e ácidos graxos (Kriisa et al., 2017). Dentre estas, níveis elevados de ácidos graxos de cadeia longa e níveis reduzidos de ácidos graxos de cadeia curta em pacientes em primeiro surto psicótico não tratados (Kriisa et al., 2017). Também foram encontrados níveis aumentados de ácidos graxos e corpos cetônicos no soro e urina de pacientes, sugerindo uma supra-regulação no catabolismo de ácidos graxos na esquizofrenia (Yang et al., 2013).

Estudos também sugerem que o tratamento com antipsicóticos pode compensar ou reverter desregulações em vias lipídicas relacionadas ao estágio

inicial do distúrbio (Narayan et al., 2009; McEvoy et al., 2013; Kriisa et al., 2017; Leppik et al., 2019). Neste contexto, o metabolismo de ácidos graxos e a biossíntese de colesterol foram apontados, por estudos de expressão gênica, como elementos chave na resposta ao tratamento com antipsicóticos (Ferno et al., 2006; Polymeropoulos et al., 2009). Uma das hipóteses levantadas propõe que a modulação da proporção de ácidos graxos poli-insaturados e saturados e de colesterol pelos antipsicóticos pode afetar a fluidez das membranas neurais, resultado em alterações na conectividade neural (Polymeropoulos et al., 2009) que podem estar relacionadas aos efeitos terapêuticos.

O colesterol é um importante componente das membranas plasmáticas celulares (Lange, 1992; Pal et al., 1990), atuando especialmente na determinação da permeabilidade da membrana (Dietschy, 2009). Também é fundamental no processo de formação sináptica (Mauch et al., 2001), sendo importante na sinalização neuronal e desenvolvimento cerebral (Dietschy, 2009). Cerca de 25% do colesterol corporal humano é encontrado no cérebro, sendo sintetizado localmente por astrócitos e oligodendrócitos. Ainda, 70% do colesterol cerebral está presente na mielina, enquanto os outros 30% compõem as membranas plasmáticas de neurônios e astrócitos (Bjorkhem & Meaney, 2004).

Em nossos dados, a hidroximetilglutaril-CoA sintase (ou HMG-CoA sintase), responsável pela formação de 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) está supra-regulada. A supra-regulação do gene da hidroximetilglutaril-CoA sintase 1 (HMGCS1) foi previamente descrita por estudos que avaliaram o efeito de clozapina, olanzapina, haloperidol, clorpromazina e risperidona em linhagens humanas de glioma (Ferno et al., 2006) e célula epitelial pigmentar da retina (ARPE-19) (Polymeropoulos et al., 2009). O HMG-CoA é um intermediário tanto da síntese de colesterol, quanto da cetogênese. Neste contexto, a supra-regulação desta enzima pode contribuir para a síntese de colesterol, um importante componente da mielina e peça fundamental do metabolismo dos oligodendrócitos, o que pode estar relacionado ao efeito terapêutico dos antipsicóticos.

Além de proteínas relacionadas à ubiquitinação, degradação pelo proteassomo, e metabolismo de lipídios, os três tratamentos modularam proteínas relacionadas ao reparo de danos ao DNA, tais como RECQL (do inglês *ATP-dependent DNA helicase Q1*), TRIM28 (do inglês *Tripartite motif-containing 28*), RAD21 (do inglês *Double-strand-break repair protein*) e RNF113A (do inglês *Ring*

Finger Protein 113A). Sendo assim, esses processos parecem ser relevantes na resposta aos antipsicóticos nos oligodendrócitos, estando possivelmente relacionados aos efeitos terapêuticos desses medicamentos.

Ainda, as vias canônicas moduladas pelos tratamentos com haloperidol e clozapina estão representados na figura 10. As vias em tons de vermelho estão previstas supra-reguladas, enquanto as em tons de azul previstas infra-reguladas, de acordo com a previsão do IPA. Neste contexto, a sinalização por proteínas Rho GTPases é evidente no tratamento com haloperidol, enquanto processos envolvidos com o citoesqueleto de actina e a sinalização por EIF2 são modulados por ambos os medicamentos.

Neste contexto, EIF2 (fator de iniciação eucariótico -2) é um fator de iniciação de transcrição que media a ligação de Met-tRNA ao ribossomo de uma forma dependente de GTP, sendo fundamental para a síntese de proteínas pelo ribossomo (Carter, 2007). Mutações associadas a EIF2B estão associadas a doença da substância branca evanescente, que provoca uma perda severa de oligodendrócitos e astrócitos no começo da vida (Pronk et al, 2006). Neste contexto, EIF2B desempenha um papel fundamental na manutenção da viabilidade dos oligodendrócitos, sendo que quando sua atividade é comprometida pode ocorrer uma resposta disfuncional ao estresse celular (Carter, 2007).

Um estudo prévio de nosso grupo observou a modulação de proteínas relacionadas à sinalização por EIF2 nos tratamentos com haloperidol, clorpromazina e risperidona (Brandão-Teles et al., 2019). O tratamento com haloperidol contribuiu para a infra-regulação desta via, enquanto o tratamento com clozapina supra-regulou a via, segundo à previsão do IPA. As proteínas relacionadas à sinalização por EIF2 moduladas por esses tratamentos estão listadas nas tabelas 4 e 5. Sendo assim, antipsicóticos típicos e atípicos podem ter efeitos distintos na síntese de proteínas (Brandão-Teles et al., 2019), assim como na manutenção da viabilidade dos oligodendrócitos, mediada pela sinalização por EIF2.

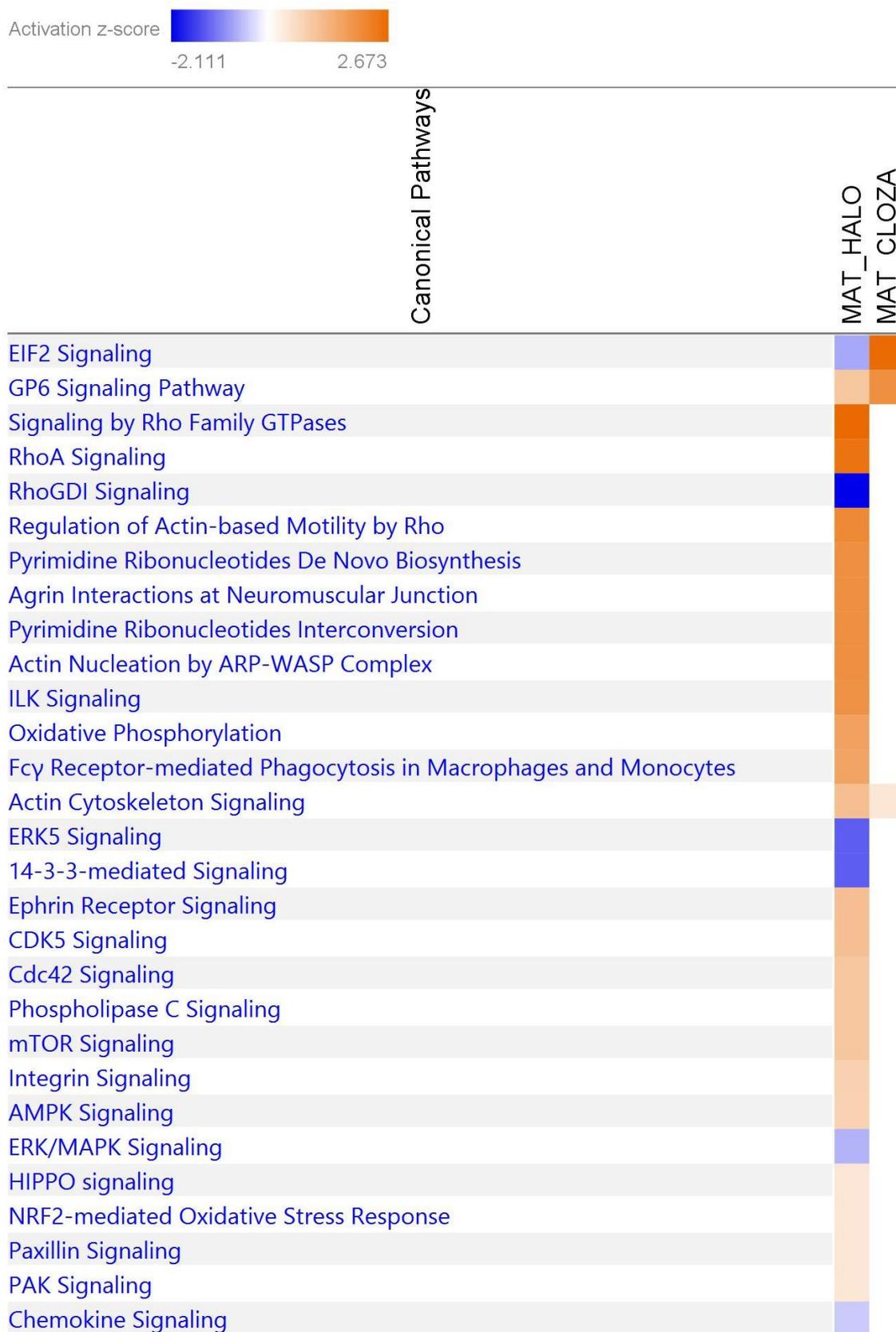


Figura 10: Vias canônicas moduladas pelos tratamentos com haloperidol e com clozapina. As vias em tons de vermelho estão previstas supra-reguladas, enquanto as em tons de azul previstas infra-reguladas.

Tabela 4: Proteínas moduladas pelo tratamento com haloperidol relacionadas à sinalização por EIF2.

Símbolo	Nome (em inglês)	Regulação
ACTA1	Actin, alpha 1, skeletal muscle	
ACTC1	Actin, alpha, cardiac muscle 1	
EIF2S2	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit beta	
EIF3A	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A	
EIF3I	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I	
EIF4A3	Eukaryotic translation initiation factor 4A3	
EIF5B	Eukaryotic translation initiation factor 5B	Aumentada
FAU	FAU, ubiquitin like and ribosomal protein S30 fusion	
HSPA5	Heat shock protein family A (Hsp70) member 5	Diminuída
MAP2K1	Mitogen-activated protein kinase kinase 1	Aumentada
PPP1CB	Protein phosphatase 1 catalytic subunit beta	Aumentada
RPL4	Ribosomal protein L4	Aumentada
RPL9	Ribosomal protein L9	Aumentada
RPL10	Ribosomal protein L10	Aumentada
RPL11	Ribosomal protein L11	Aumentada
RPL13	Ribosomal protein L13	Aumentada
RPL17	Ribosomal protein L17	Aumentada
RPL32	Ribosomal protein L32	Aumentada
RPL35	Ribosomal protein L35	Aumentada
RPL27A	Ribosomal protein L27a	Aumentada
RPL35A	Ribosomal protein L35a	Aumentada
RPLP1	Ribosomal protein lateral stalk subunit P1	Aumentada
RPLP2	Ribosomal protein lateral stalk subunit P2	Aumentada
RPS6	Ribosomal protein S6	Aumentada
RPS12	Ribosomal protein S12	
RPS16	Ribosomal protein S16	
RPS19	Ribosomal protein S19	
RPS20	Ribosomal protein S20	
RPS23	Ribosomal protein S23	
RPS25	Ribosomal protein S25	
RPS28	Ribosomal protein S28	
RPS3A	Ribosomal protein S3A	
RPS4X	Ribosomal protein S4 X-linked	

Tabela 5: Proteínas moduladas pelo tratamento com clozapina relacionadas à sinalização por EIF2.

Sigla	Nome (em inglês)	Regulação
EIF3A	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A	
EIF3E	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E	
PTBP1	Polypyrimidine tract binding protein 1	
RPL4	Ribosomal protein L4	Aumentada
RPL10	Ribosomal protein L10	Aumentada
RPL27	Ribosomal protein L27	Aumentada
RPL31	Ribosomal protein L31	Aumentada
RPL34	Ribosomal protein L34	Aumentada
RPL35	Ribosomal protein L35	Aumentada
RPL37A	Ribosomal protein L37a	Aumentada
RPS2	Ribosomal protein S2	
RPS25	Ribosomal protein S25	

A sinalização relacionada ao citoesqueleto de actina também sofreu modulação pelo tratamento com haloperidol e clozapina, estando supra-regulada em ambos os casos. A actina é fundamental na estabilização e manutenção da morfologia celular, e sua dinâmica é a base de diversos processos celulares centrais, tais como a motilidade celular e o tráfego intracelular de proteínas (Dominguez & Holmes, 2011). Muitas proteínas cruciais na estabilização do citoesqueleto de actina estão expressas de forma alterada na esquizofrenia (Bhambhani et al., 2017). No sistema nervoso, por exemplo, esse processo é fundamental na manutenção da morfologia e densidade de espinhas dendríticas (Glausier & Lewis, 2013).

A regulação do citoesqueleto de actina já foi relacionada à esquizofrenia por diversos estudos (Bhambhani et al., 2017; Yan et al., 2016; Zhao et al., 2015; Hill et al., 2006), incluindo uma análise transcriptômica de tecido cerebral *post-mortem* de pacientes (Zhao et al., 2015). Neste contexto, foram observadas alterações na expressão de proteínas envolvidas em vias de regulação da polimerização da actina no córtex cingulado anterior (Bhambhani et al., 2017), além de alterações na expressão de proteínas regulatórias da dinâmica da actina no córtex pré-frontal dorsolateral (DLPFC) de pacientes com esquizofrenia (Yan et al., 2016). Sendo assim, é possível

que os tratamentos com haloperidol e clozapina auxiliem na normalização das alterações nas proteínas envolvidas com o citoesqueleto de actina, o que pode ter relação com os efeitos terapêuticos desses medicamentos. As proteínas que sofreram modulação por esses tratamentos e que estão relacionadas ao citoesqueleto de actina estão dispostas nas tabelas 6 e 7.

Tabela 6: Proteínas moduladas pelo tratamento com haloperidol relacionadas ao citoesqueleto de actina.

Sigla	Nome (em inglês)	Regulação
ACTA1	Actin, alpha 1, skeletal muscle	Aumentada
ACTC1	Actin, alpha, cardiac muscle 1	Aumentada
ACTN1	Actinin alpha 1	Aumentada
ACTR3	ARP3 actin related protein 3 homolog	Aumentada
APC2	APC2, WNT signaling pathway regulator	Aumentada
CFL1	Cofilin 1	Diminuída
EZR	Ezrin	Aumentada
FN1	Fibronectin 1	Aumentada
ITGB1	Integrin subunit beta 1	Aumentada
MAP2K1	Mitogen-activated protein kinase kinase 1	Aumentada
MYH11	Myosin heavy chain 11	Aumentada
MYL2	Myosin light chain 2	Aumentada
MYL4	Myosin light chain 4	Aumentada
MYL12B	Myosin light chain 12B	Aumentada
PPP1CB	Protein phosphatase 1 catalytic subunit beta	Diminuída
PPP1R12B	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 12B	Diminuída
RAC2	Rac family small gtpase 2	Aumentada
TLN1	Talin 1	Aumentada
TMSB10/TMSB4X	Thymosin beta 4 X-linked	Aumentada

Tabela 7: Proteínas moduladas pelo tratamento com clozapina relacionadas ao citoesqueleto de actina.

Sigla	Nome (em inglês)	Regulação
ARPC2	Actin related protein 23 complex subunit 2	Aumentada
FN1	Fibronectin 1	Aumentada
GSN	Gelsolin	Diminuída
MYH6	Myosin heavy chain 6	Aumentada
MYL1	Myosin light chain 1	Aumentada

6.1.1. Haloperidol x Veículo

Nas células maturadas, o tratamento com haloperidol modulou, em comparação com o veículo, proteínas relacionadas ao metabolismo (especialmente de RNA e proteínas), sistema imune, transdução de sinal, guidance axonal, transcrição, dentre outros. Os processos biológicos nos quais essas proteínas estão envolvidas estão representados na figura 11.

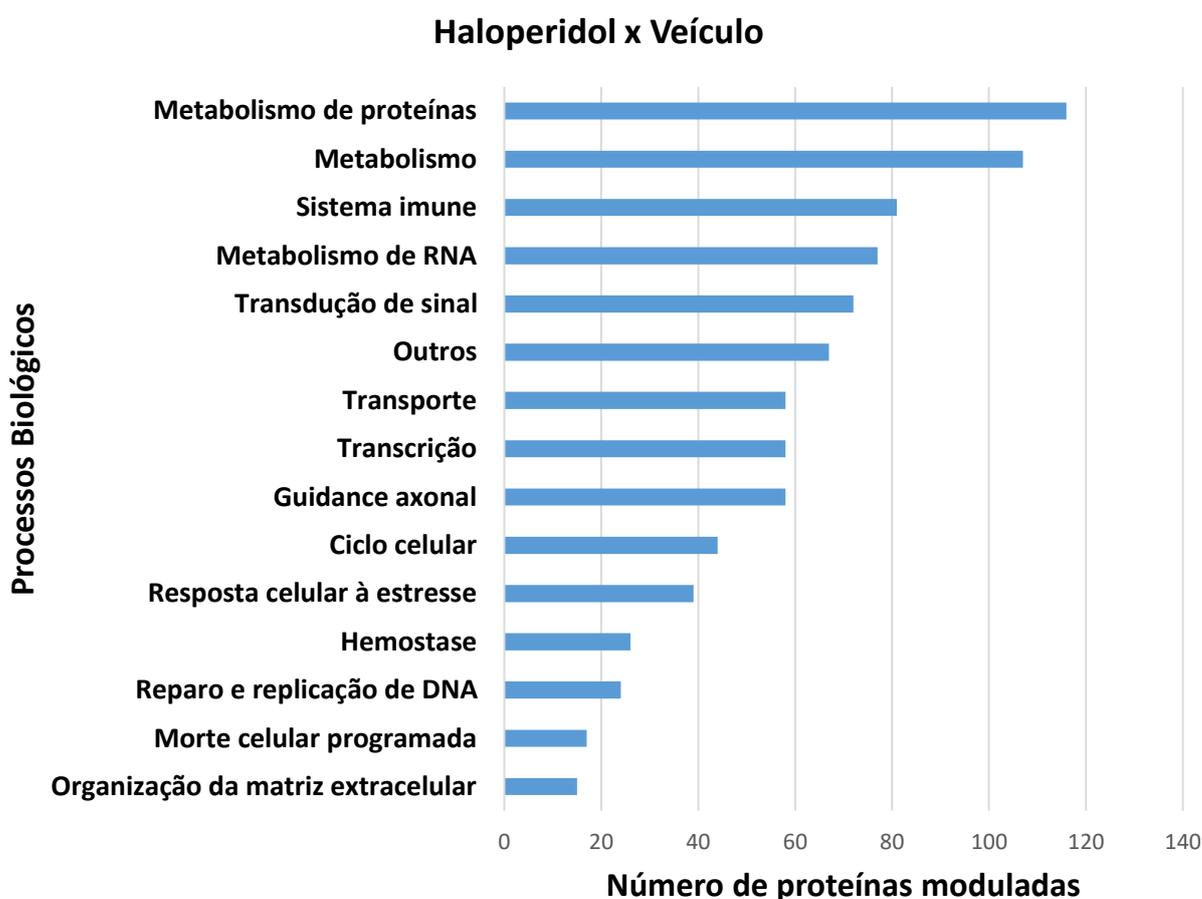


Figura 11: Processos biológicos nas quais as proteínas diferencialmente reguladas pelo tratamento com haloperidol estão envolvidas em MO3.13 maturadas (em comparação com o veículo).

Em relação às proteínas envolvidas no metabolismo proteico, diversas estão relacionadas às modificações pós traducionais. Dentre essas modificações, estão a glicosilação N-ligada por asparagina, nediilação, sumoilação, deubiquitinação e fosforilação. Dentre as relacionadas com a transdução de sinal, estão: sinalização por

receptores tirosina-quinase, TGF-beta, GPCR, via NOTCH, via WNT, Hedgehog, MAPK, Rho GTPases e sinalização intracelular por mensageiros secundários. Ainda, um número considerável de proteínas diferencialmente reguladas relacionadas ao sistema imune estão envolvidas na sinalização por citocinas, especialmente interleucinas, reforçando o papel do sistema imune no contexto da esquizofrenia.

Dentre as proteínas associadas ao metabolismo de aminoácidos e derivados, estão diversas proteínas envolvidas na síntese de selenocisteína. Esta, é um aminoácido análogo a cisteína, em que o átomo de enxofre é substituído por um de selênio. A selenocisteína é encontrada em tRNAs e no sítio catalítico de algumas enzimas, como a glutathione peroxidase, por exemplo, (Gonzalez-Flores et al., 2013) responsável pela catálise de H₂O₂ e peróxidos lipídicos (Cohen & Hochstein, 1963). A atividade desta enzima, portanto é selenocisteína-dependente (Rotruck et al. 1973; Flohe et al., 1973; Gonzalez-Flores et al., 2013). Foram identificadas cerca de 25 selenoproteínas no proteoma humano (Kryukov et al., 2003). Destas, 12 conferem proteção celular contra estresse oxidativo (Rayman, 2012; Steinbrenner & Sies, 2009; Panee et al., 2007).

Estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio no balanço entre a produção de radicais livres e a atuação mecanismos de defesa antioxidantes. Os radicais livres, ao entrarem em contato com ácidos graxos da membrana plasmática iniciam uma reação em cascata denominada cascata de peroxidação lipídica. Esta, pode danificar a integridade da membrana e alterar um número considerável de proteínas associadas a mesma, incluindo receptores. Esse processo resulta, por exemplo, na interrupção da comunicação celular e morte das células (Lohr et al., 2003). Diversos estudos apontaram esse estresse como um dos mecanismos envolvidos na patogênese da esquizofrenia (Behrens & Sejnowski, 2009; Bošković et al., 2011) e no declínio de funções cognitivas (Abdel-Salam et al., 2012).

Além disso, há evidências sugerindo um aumento no estresse oxidativo associado ao uso de antipsicóticos, especialmente a medicamentos típicos (Dakhale et al., 2004; Pillai et al., 2007; Martins et al., 2008; Cho & Lee, 2013), como o haloperidol (Abdel-Salam et al., 2012; Cho & Lee, 2013). O estudo de Abdel-Salam et al. (2012), por exemplo, demonstrou que a administração de haloperidol resultou em um aumento nos níveis de malondialdeído (MDA), um marcador de estresse oxidativo, e óxido nítrico em modelo animal. Além disso, os autores também encontraram uma

diminuição nos níveis de glutathiona em diversas regiões cerebrais (Abdel-Salam et al., 2012).

Neste contexto, é importante ressaltar que o tratamento crônico com haloperidol é comumente associado à efeitos colaterais extrapiramidais, tais como tremores, rigidez, e movimentos involuntários (Abdel-Salam et al., 2012). Esses efeitos se desenvolvem em cerca de 40–76% de pacientes cronicamente tratados com a droga (Parkes, 1982; Soares-Weiser & Fernandez, 2007). O uso crônico de haloperidol também é associado a prejuízos de aprendizagem e memória, tanto em humanos, quanto em modelos animais (Abdel-Salam et al., 2012). Um outro efeito colateral notável associado ao uso dessa droga é a discinesia tardia.

A discinesia tardia é um sério efeito colateral do uso prolongado de antipsicóticos, especialmente típicos (Cho & Lee, 2013). Cerca de 20-30% dos pacientes com esquizofrenia tratados com antipsicóticos de primeira geração desenvolvem essa condição (Jeste & Caligiuri, 1993, Kane et al., 1988, Yassa & Jeste, 1992). O sinal típico da discinesia tardia são movimentos orofaciais involuntários, mas o tronco e as extremidades também podem ser afetados (Cho & Lee, 2013). O desenvolvimento desta condição parece ser multifatorial, sendo o estresse oxidativo apontado como um dos fatores associados (Cho & Lee, 2013). Neste contexto, deficiências nos mecanismos de defesa contra radicais livres podem estar relacionados ao desenvolvimento da discinesia tardia (Cho & Lee, 2013).

O tratamento com haloperidol modulou proteínas envolvidas na síntese de selenocisteína, um aminoácido importante na constituição e função de enzimas envolvidas na proteção celular contra estresse oxidativo, como a glutathiona peroxidase, por exemplo. Sendo assim, o comprometimento da síntese de selenocisteína pode afetar o funcionamento dessas enzimas, contribuindo para um quadro de estresse oxidativo, relacionado ao desenvolvimento da discinesia tardia e outros efeitos colaterais característicos de antipsicóticos típicos.

Além disso, diversas proteínas envolvidas na sinalização por Rho-GTPases, importantes na regulação do citoesqueleto de actina, sofreram modulação pelo tratamento com haloperidol. Neste contexto, estudos *post-mortem* relataram uma diminuição na expressão de proteínas pertencentes à família das Rho-GTPases (Hill et al., 2006; Hayashi-Takagi et al., 2010) na esquizofrenia. Os níveis de mRNA da Rho GTPase Cdc42 (do inglês *cell division cycle 42*), envolvida na regulação da polimerização da actina (Scott et al., 2003; Saneyoshi et al., 2010) estão diminuídos

no DLPFC de pacientes com esquizofrenia (Hill et al., 2006), por exemplo. Além disso, anormalidades na sinalização por Rho-GTPases foram identificadas como uma causa proeminente de déficits intelectuais (Allen et al., 1998; Ramakers, 2002). Ainda, a desregulação da via de RhoA, crucial no controle do tamanho e conectividade cerebral, é considerada um fator de risco para o desenvolvimento de autismo e esquizofrenia (Lin et al., 2015).

Neste contexto, o tratamento com haloperidol modulou proteínas envolvidas na sinalização por Rho-GTPases, incluindo a supra-regulação da sinalização por RhoA e por Cdc42, e a infra-regulação de RhoGDI. Sendo assim, é possível que esse medicamento auxilie na normalização dos níveis das proteínas envolvidas na sinalização por Rho-GTPases, o que pode ter relação com os efeitos terapêuticos da droga em questão.

6.1.2. Clozapina x Veículo

Nas células maturadas, o tratamento com clozapina modulou, em comparação com o veículo, proteínas relacionadas ao metabolismo (especialmente de mRNA e proteínas), regulação da expressão gênica, processamento de RNA, guidance axonal (especialmente proteínas SLITs e ROBO), transdução de sinal, resposta celular ao estresse, dentre outros. Os processos biológicos nos quais essas proteínas estão envolvidas estão representados na figura 12. Por sua vez, a rede de interação das proteínas diferencialmente reguladas por este tratamento está disposta na figura 13. Nesta, alguns processos são evidenciados, como a organização ou biogênese de componentes celulares, guidance axonal, metabolismo de mRNA e conjugação à ubiquitina.

O tratamento com clozapina modulou diversas proteínas relacionadas ao metabolismo, dentre elas: a sintase de ácidos graxos (supra-regulada), a piruvato quinase (supra-regulada), a D-3-fosfoglicerato desidrogenase (PHGDH) (supra-regulada), a subunidade 5B da citocromo c oxidase (supra-regulada), e a acil-CoA desidrogenase de ácidos graxos de cadeia média (infra-regulada). Ainda, observou-se a modulação de proteínas envolvidas na proteção contra o estresse oxidativo, como a glutaredoxina, a super-óxido dismutase e a tioredoxina, e a supra-regulação de proteínas *heat-shock*, tais como HSP70 e HSP90.

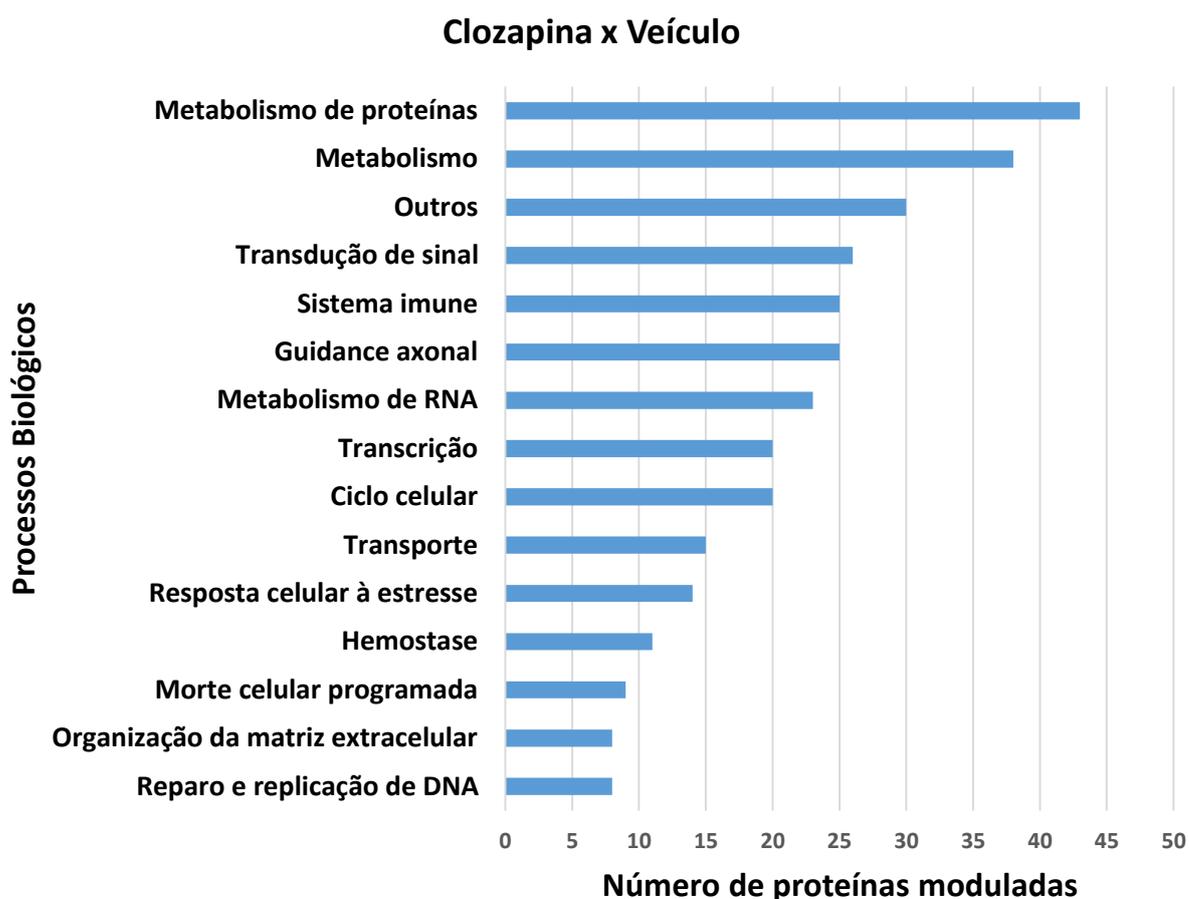


Figura 12: Processos biológicos nas quais as proteínas diferencialmente reguladas pelo tratamento com clozapina estão envolvidas em MO3.13 maturadas (em comparação com o veículo).

Proteínas *Heat-Shock* (HSPs) são o grupo mais representativo de chaperonas, proteínas fundamentais no dobramento e regulação de diversas proteínas celulares (Kaneta et al., 2017). Neste contexto, estão envolvidas em diversos fenômenos cerebrais, incluindo o crescimento de neuritos (Ishima et al., 2012), diferenciação neuronal (Loones et al., 2000), polarização (Benitez et al., 2014), e neurodegeneração (Luo et al., 2010). HSPs, especialmente HSP70 e HSP90, são expressas de forma constitutiva, desempenhando um papel crucial no destino neural no sistema nervoso adulto (Aquino et al., 1993; Quraishi et al., 1995). Ainda, indícios sugerem que o dobramento incorreto de proteínas, a agregação proteica e expressão de HSPs podem estar envolvidas na patogênese de diversas doenças neurodegenerativas, incluindo doenças de Alzheimer, Huntington, Parkinson, e doenças priônicas (Benn et al., 2004; Sherman et al., 2001).

Os antipsicóticos atípicos olanzapina, aripiprazol e blonaserina foram associados a aumentos na expressão de HSP90 em células NG2 (+) (células progenitoras que expressam o proteoglicano NG2) diferenciadas da zona subventricular de ratos adultos (Kaneta et al., 2017). Ainda, a supra-regulação de HSP90 pelo tratamento com esses antipsicóticos foi fundamental na reversão de déficits na diferenciação de interneurônios gabaérgicos a partir de células NG2(+), induzidas por MK-801, um antagonista do receptor de NMDA (Kaneta et al., 2017). Em contrapartida, o tratamento com haloperidol não reverteu a diminuição nos níveis de HSP90 induzidas pelo tratamento com MK-801, nem os déficits associados à diferenciação de interneurônios gabaérgicos. Ainda, o aumento nos níveis de HSP90 também foi associado à potencialização do crescimento de neuritos induzido por NGF em células PC12, utilizada como modelo de diferenciação neuronal (Ishima et al., 2012).

O tratamento com clozapina supra-regulou proteínas *heat-shock*, como a HSP90, que parece ser benéfica na diferenciação neuronal e manutenção da homeostase neural. Dessa forma, a supra-regulação de proteínas *heat shock* pode contribuir para o dobramento correto de proteínas, evitando a agregação de proteínas disfuncionais e possíveis consequências patológicas associadas a esse quadro, o que pode contribuir para os efeitos terapêuticos associados ao tratamento.

O tratamento com clozapina também modulou proteínas envolvidas na proteção contra o estresse oxidativo, dentre elas a tioredoxina (TRX). Esta é uma proteína ubíqua com atividade de óxido redutase que desempenha um papel importante na proteção contra o estresse oxidativo (Holmgren, 1985), associado, dentre outros fatores, à déficits cognitivos na esquizofrenia (Bitanihirwe & Woo, 2011; Yao & Keshavan, 2011). Foram observados níveis sorológicos aumentados de TRX em pacientes com esquizofrenia não tratados em primeiro episódio psicótico, tanto em comparação com pacientes tratados com antipsicóticos, quanto com indivíduos controles (Zhang et al., 2009). Os estudos de Owe-Larsson et al. (2011) e Bas et al. (2017) também relaram níveis aumentados de TRX, no plasma e soro de pacientes, respectivamente (Owe-Larsson et al., 2011; Bas et al., 2017). Ainda, os níveis sorológicos de TRX também sofreram alterações entre os estados de psicose aguda e remissão (Bas et al., 2017), sendo mais elevados durante episódios de psicose aguda, com uma tendência a diminuição após o tratamento (Bas et al., 2017).

Os níveis sanguíneos de TRX também foram relacionados positivamente aos sintomas positivos da esquizofrenia, tendendo a diminuir após o tratamento com antipsicóticos (Wu et al., 2013). Segundo nossos dados, a tioredoxina foi infra-regulada em oligodendrócitos pelo tratamento com clozapina. Sendo assim, a infra-regulação da tioredoxina pode estar associada aos efeitos terapêuticos da clozapina, dentre eles a melhora de sintomas positivos.

axonal. As em rosa no metabolismo de mRNA. As em vermelho no metabolismo celular e as em azul claro na conjugação à ubiquitina. As interações entre elas estão representadas por linhas conectando os nódulos.

A figura 14, por sua vez, corresponde ao interactoma das proteínas moduladas exclusivamente pelo tratamento com clozapina, sendo as interações representadas pelas linhas conectando os nódulos. Processos como a organização ou biogênese de componentes celulares, metabolismo de mRNA e metabolismo de proteínas celulares são bem expressivos neste tratamento.

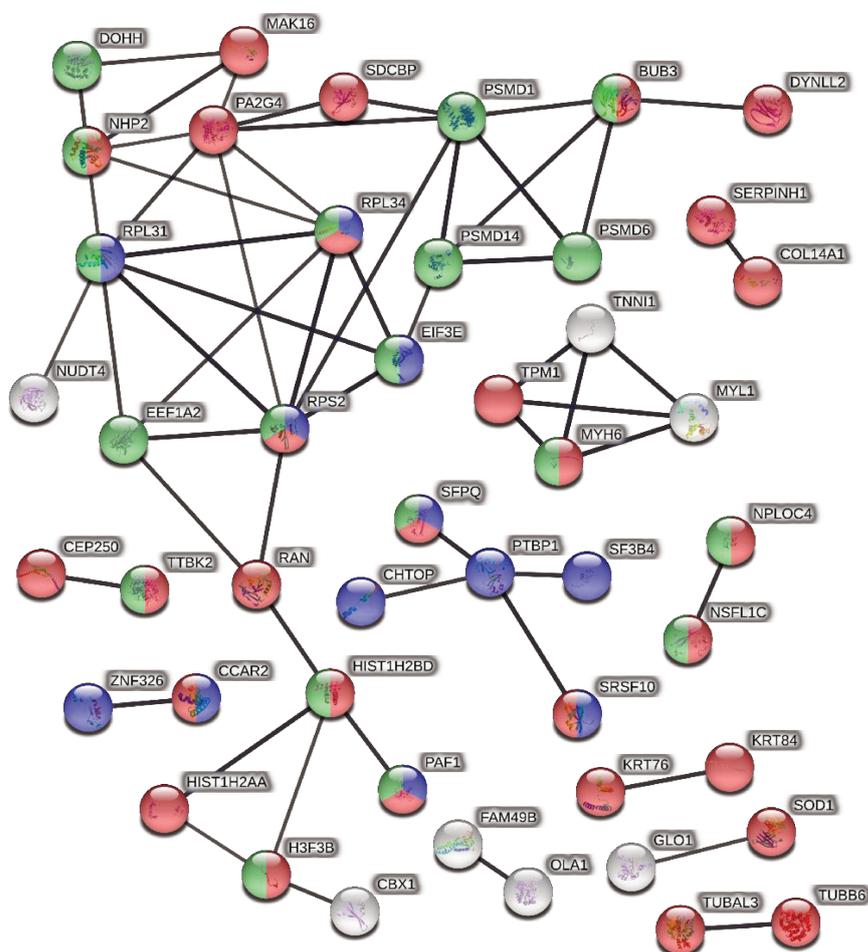


Figura 14: Interactoma das proteínas diferencialmente reguladas exclusivamente pelo tratamento com clozapina. As coloridas em azul escuro estão envolvidas no metabolismo de mRNA. As em vermelho na organização ou biogênese de componentes celulares, e as em verde no metabolismo de proteínas celulares. As interações entre elas estão representadas por linhas conectando os nódulos. Quanto mais escura a linha, maior o grau de confiança a respeito da interação, calculado a partir de evidências encontradas na literatura e bancos de dados.

A mitocôndria é uma organela amplamente conhecida pela produção de energia, através da cadeia transportadora de elétrons e fosforilação oxidativa. Além disso, está envolvida em uma série de outros processos celulares, tais como a produção de espécies reativas de oxigênio, regulação da apoptose, e modulação da atividade sináptica (Roberts, 2017). Mitocôndrias são organelas plásticas e dinâmicas, que, em resposta às demandas energéticas, podem sofrer alterações de tamanho, forma, número e localização (Roberts, 2017). A forma geral da mitocôndria pode ter implicações funcionais (Youle & van der Bliek, 2012; Ahmad et al., 2013). Além disso, a morfologia da crista, matriz e membrana mitocondrial interna tem relação com a atividade da cadeia transportadora de elétrons (Hackenbrock, 1968). Ainda, o balanço entre os processos de fusão e fissão é importante na manutenção da estrutura, função, integridade (Legros et al., 2002), localização e forma mitocondrial (Flippo & Strack, 2017).

Estudos com amostras humanas associaram a função mitocondrial à desordens psiquiátricas (Konradi & Öngür, 2017). Evidências de disfunções mitocondriais na esquizofrenia incluem anormalidades metabólicas, enzimáticas, anatômicas e genéticas (Roberts, 2017). Dentre essas, está o número reduzido de mitocôndrias em oligodendrócitos nas substâncias cinzenta e branca do córtex cingulato anterior (Uranova et al., 2007; Vikhрева et al., 2016), que pode afetar o suprimento energético dessas células, e ter impactos subsequentes no processo de mielinização (Roberts, 2017). Ainda, observou-se um número reduzido de mitocôndrias por sinapse no caudado e putâmen na esquizofrenia (Roberts, 2017). No caudado, há uma diminuição do número de mitocôndrias em astrócitos (Uranova et al., 1996), e redução do tamanho mitocondrial nos oligodendrócitos (Uranova et al., 2001).

A severidade dos déficits mitocondriais foi correlacionada positivamente com a severidade dos sintomas positivos, evidenciando uma possível relação entre sintomas paranóicos e disfunções nas mitocôndrias (Uranova et al., 2007). Os antipsicóticos, por sua vez, podem alterar o número, tamanho e função mitocondrial, dependendo da região cerebral, dose, tempo de uso e rotina de administração (Roberts, 2017).

Neste contexto, algumas proteínas relacionadas à função e dinâmica mitocondrial foram moduladas pelo tratamento com clozapina, tais como: a subunidade 5B da citocromo c oxidase (supra-regulada), a acil-CoA desidrogenase de ácidos graxos de cadeia média (infra-regulada), a TOM34 (translocase de membrana

mitocondrial externa 34) (infra-regulada) e a TIM13 (translocase de membrana mitocondrial interna 13) (infra-regulada). Além disso, proteínas relacionadas à organização ou biogênese de componentes celulares também foram moduladas por esse tratamento. Sendo assim, é possível que a modulação de proteínas envolvidas tanto na função e dinâmica mitocondrial, quanto na organização e biogênese de organelas contribuam para a normalização da biologia mitocondrial, tanto a nível estrutural, quanto na localização e número de organelas. Isso pode ter impacto em processos como a mielinização e suprimento energético dos axônios neuronais, funções importantes dos oligodendrócitos na manutenção da conectividade neural. Tais efeitos podem ser importantes a nível terapêutico, contribuindo para a normalização de anormalidades mitocondriais associadas à esquizofrenia.

6.1.3. Clozapina + D-Serina x Veículo

Nas células maturadas, o tratamento com clozapina + D-serina modulou, em comparação com o veículo, proteínas relacionadas ao metabolismo, transdução de sinal, sistema imune, transporte, dentre outros. Os processos biológicos nos quais essas proteínas estão envolvidas estão representados na figura 15. Por sua vez, a rede de interação das proteínas diferencialmente reguladas por este tratamento está disposta na figura 16. Nesta, alguns processos são evidenciados, tais como a organização ou biogênese de componentes celulares (especialmente organelas), processos metabólicos, e o metabolismo de compostos nitrogenados, por exemplo.

Uma das proteínas supra-reguladas pelo tratamento com clozapina + D-serina em comparação com o veículo foi a cistationina- β -sintase (CBS). Esta enzima catalisa a conversão de homocisteína (Hcy) em cistationina, na primeira etapa da via de transulfuração, que envolve a interconversão de cisteína e homocisteína, através da cistationina intermediária (Nozaki et al., 2001). Esta via é de suma importância na remoção do excesso de aminoácidos contendo enxofre (Banerjee & Zou, 2005), como a homocisteína (Jhee & Kruger, 2005).

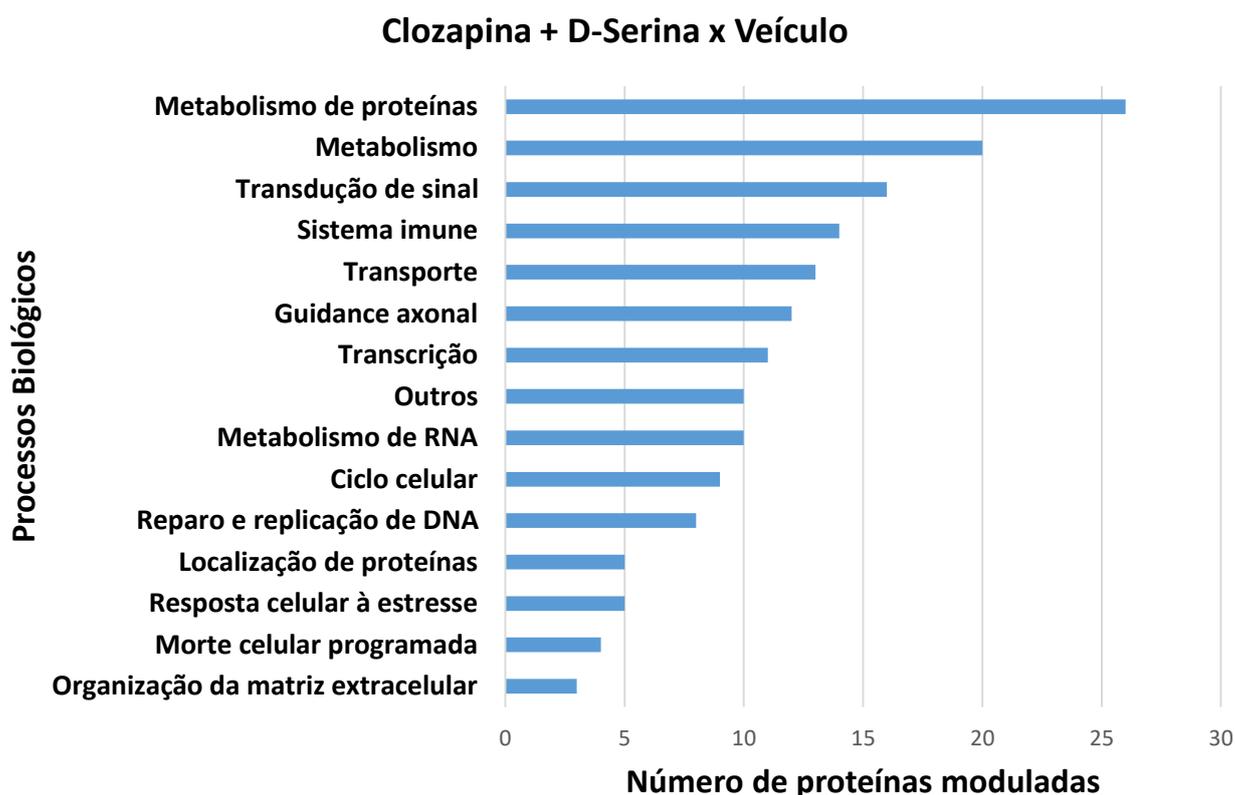


Figura 15: Processos biológicos nas quais as proteínas diferencialmente reguladas pelo tratamento com clozapina + D-serina estão envolvidas em MO3.13 maturadas (em comparação com o veículo).

A homocisteína apresenta um papel chave no ciclo da metionina, que provê grupamentos metil para reações gerais de metilação, e gera diversas moléculas metiladas fisiologicamente ativas (Feng et al., 2009). Este aminoácido influencia a função neuronal e o desenvolvimento cerebral através de múltiplas vias celulares, incluindo o acúmulo citossólico de cálcio, indução de estresse oxidativo, apoptose (Ho et al., 2002) e alterações na metilação do DNA (Kruman et al., 2000). Através dessas vias, a homocisteína, quando em excesso, parece afetar a plasticidade neuronal e promover a degeneração neuronal, por seu efeito neurotóxico (Lipton et al., 1997), além de aumentar a vulnerabilidade de neurônios do hipocampo à excitotoxicidade (Kruman et al., 2000). Além disso, diversas evidências associam os níveis alterados de homocisteína a anormalidades no neurodesenvolvimento, em decorrência de efeitos na vasculatura (Brown et al., 2007) e estresse oxidativo (Krebs et al., 2009), através de alterações na produção de glutatona e cisteína (Krebs et al., 2009).

Em pacientes com esquizofrenia, foi observado um aumento nos níveis plasmáticos e/ou sorológicos de homocisteína (Feng et al., 2009; Haidemenos et al., 2007; Dietrich-Muszalska et al., 2012; Wysokinski & Kloszewska, 2013; Ma et al., 2009; Song et al., 2014; Yazici et al., 2019), com uma aparente correlação positiva entre os níveis de Hcy e a severidade de sintomas negativos (Petronijevic et al., 2008; Misiak et al., 2014; Yazici et al., 2019) e efeitos colaterais extrapiramidais (Goff et al., 2004). Ainda, a hiperhomocisteinemia parece estar relacionado à danos na substância branca (Vermeer et al. 2002; de Lau et al. 2009), à piora na performance cognitiva (de Lau et al. 2009) e à síndrome metabólica em pacientes com esquizofrenia (Vuksan-Ćusa et al., 2011).

A Hcy interage com receptores NMDA, atuando tanto como agonista (em altos níveis de glicina), quanto como antagonista parcial (em níveis normais ou reduzidos de glicina) (Lipton et al., 1997). Neste contexto, a hipoatividade desse receptor em interneurônios gabaérgicos no córtex pré-frontal pode resultar em uma excitotoxicidade neuronal, contribuindo para o desenvolvimento da esquizofrenia (Insel, 2010). Sendo assim, apesar de ainda serem necessários estudos mais detalhados a respeito dos mecanismos envolvidos, o aumento nos níveis de homocisteína parece contribuir para a fisiopatologia da esquizofrenia (Krebs et al., 2009; Kale et al., 2010; Yazici et al., 2019).

Neste contexto, estratégias focadas na redução dos níveis de homocisteína, como a suplementação oral com vitamina B12, B6 e ácido fólico, parecem contribuir para a melhora dos sintomas em pacientes com esquizofrenia com hiperhomocisteinemia (Levine et al., 2006). Além disso, Yazici et al. (2019) verificou que os níveis séricos de homocisteína sofreram uma diminuição significativa em pacientes após o tratamento com risperidona (Yazici et al., 2019). Neste contexto, a supra-regulação da cistationina- β -sintase (CBS) pode estar envolvida na melhora dos sintomas relacionada à administração de D-serina em conjunto com clozapina. A supra-regulação desta enzima pode contribuir para a diminuição dos níveis de Hcy, que parecem estar diretamente relacionados à severidade dos sintomas negativos. Este pode ser um dos mecanismos envolvidos na melhora em testes que avaliaram sintomas negativos e cognitivos em pacientes tratados com D-serina em associação com antipsicóticos, relatados por estudos anteriores (Heresco-Levy et al., 2005; Tsai et al., 1998b; Kantrowitz et al., 2018).

Processos metabólicos, especialmente o metabolismo de compostos nitrogenados, também são um alvo expressivo de modulação do tratamento com clozapina + D-serina, especialmente considerando a rede de interação das proteínas moduladas pelo tratamento (figura 14). Na figura 14, as proteínas coloridas em rosa estão envolvidos em processos do metabolismo (tanto anabólicos, quanto catabólicos), e em azul no metabolismo de compostos nitrogenados. Alguns estudos sugeriram uma relação entre alterações no metabolismo do nitrogênio e exacerbações e remissões sintomáticas da esquizofrenia (Gjessing, 1938; Man et al., 1947). Um deles observou uma redução dos níveis plasmáticos de aminoácidos nitrogenados em pacientes, especialmente durante crises agudas, e um aumento nos níveis desses aminoácidos com a remissão dos sintomas (Man et al., 1947).

Neste contexto, um estudo recente avaliou os níveis de derivados de N-acetil no soro de pacientes com esquizofrenia, em comparação com indivíduos controle (Huang et al., 2019). Metabólitos do grupo N-acetil são as variantes acetiladas dos aminoácidos e ácidos orgânicos, constituindo uma classe de compostos endógenos caracterizados por um sistema conjugado, constituído por um grupo acetil e uma porção nitrogenada (Huang et al., 2019). Foram observados níveis aumentados de N-acetilglutamina e níveis reduzidos de N6-acetil-L-lisina no soro de pacientes (Huang et al., 2019), além concentrações reduzidas de N-acetil-aspartato no córtex pré-frontal em pacientes crônicos (Molina et al., 2007). Tais evidências parecem indicar uma associação entre derivados de N-acetil e a esquizofrenia (Huang et al., 2019).

Ainda, estudos observaram um aumento nos níveis plasmáticos de óxido nítrico (NO) em pacientes com esquizofrenia, em comparação com indivíduos controle (Yilmaz et al., 2007, Taneli et al., 2004). Além disso, observou-se que pacientes em fase psicótica aguda apresentam um nível extremamente elevado de 3-nitrotirosina (um marcador da produção de peroxinitrito) em proteínas plasmáticas (Dietrich-Muszalska et al., 2009). Sendo assim, o peroxinitrito e outras espécies reativas de nitrogênio, incluindo o óxido nítrico e seus metabólitos, podem estar envolvidos na patofisiologia da esquizofrenia (Yilmaz et al., 2007, Taneli et al., 2004, Dietrich-Muszalska et al., 2009).

Conforme discutido, parece haver uma relação entre a desregulação dos níveis de alguns compostos nitrogenados e a esquizofrenia. Sendo assim, considerando a modulação expressiva de proteínas envolvidas no metabolismo de compostos nitrogenados, é possível que o tratamento com clozapina + D-serina auxilie na

normalização do metabolismo e níveis desses compostos, o que pode estar relacionada aos efeitos terapêuticos do tratamento.

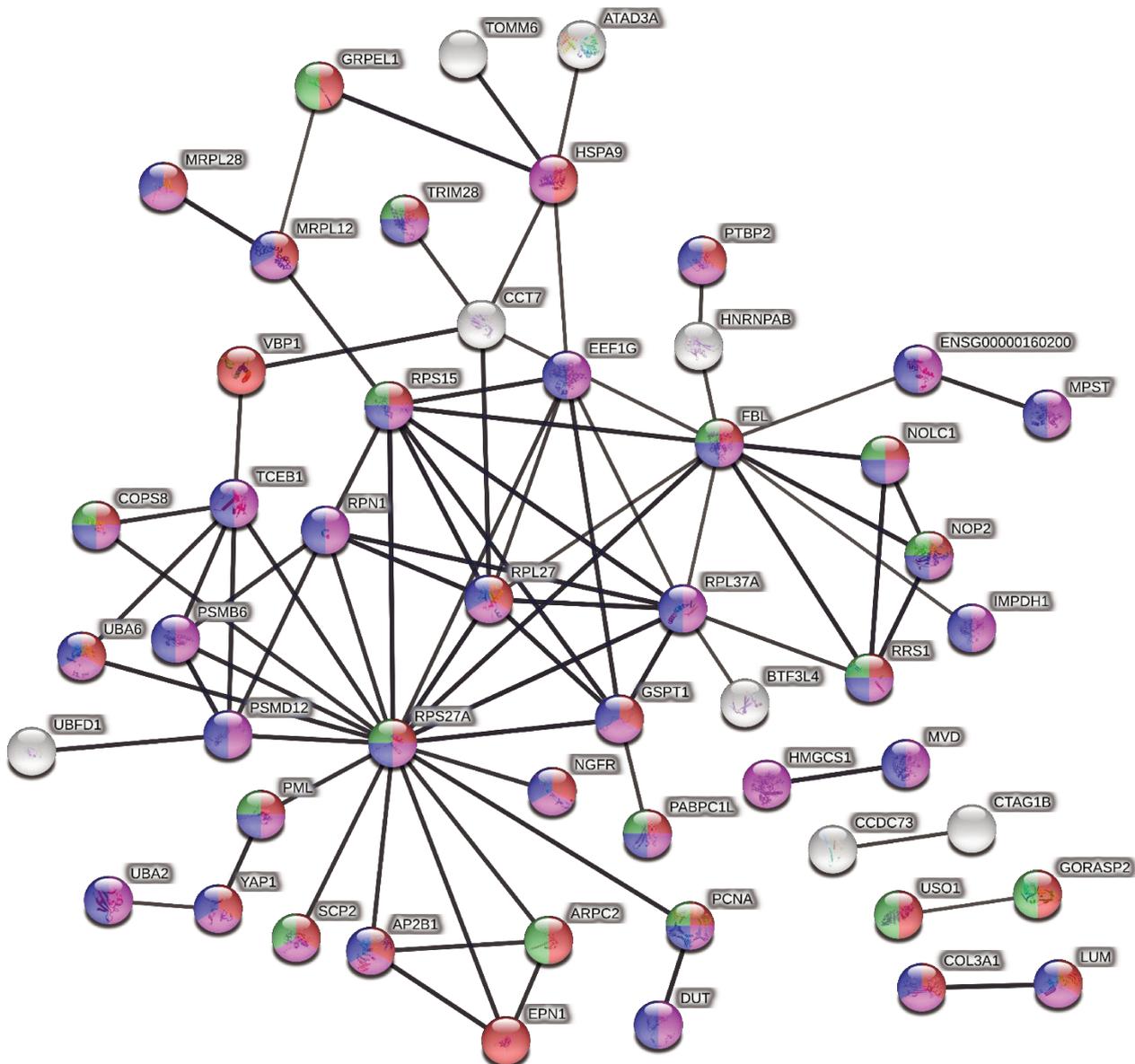


Figura 16: Interactoma das proteínas diferencialmente reguladas pelo tratamento com clozapina + D-serina, em comparação como veículo, em MO3.13 maturadas. As coloridas em vermelho estão associadas à organização ou biogênese de componentes celulares (especialmente organelas, como os ribossomos). As coloridas em rosa participam de processos metabólicos, tanto catabólicos quanto anabólicos. As em azul ao metabolismo de compostos nitrogenados, e as em verde a organização de organelas. As interações entre elas estão representadas por linhas conectando os nódulos. Quanto mais escura a linha, maior o grau de confiança a respeito da interação, calculado a partir de evidências encontradas na literatura e bancos de dados.

7. CONCLUSÃO

A esquizofrenia é um distúrbio complexo, grave, multifatorial e associado ao neurodesenvolvimento. Seu estudo requer, além da consideração de parâmetros clínicos, a compreensão de mecanismos moleculares e bioquímicos envolvidos tanto na fisiopatologia, quanto na resposta ao tratamento. Diversas metodologias, como as empregadas por transcriptômica, estudos de imagem e proteômica, têm sido utilizadas visando compreender as bases moleculares do distúrbio. Esses estudos têm associado o desenvolvimento e estabelecimento dessa desordem mental à disfunções nos sistemas neurotransmissores e nos oligodendrócitos.

Neste contexto, o presente projeto contribuiu para o aprimoramento do modelo com a linhagem de oligodendrócitos humanos MO3.13, com a proposta de um protocolo de maturação dessas células. Isto é relevante, uma vez que técnicas como a maturação e a diferenciação de linhagens e progenitores celulares são importantes para a melhoria e desenvolvimento de modelos *in vitro* significativos. Ainda, a partir desse estudo, identificamos proteínas e vias bioquímicas afetadas pelo uso de antipsicóticos e suas influências sobre as funções dos oligodendrócitos, através da caracterização de seus proteomas, por proteômica shotgun.

Algumas proteínas e processos foram comuns ao tratamento com haloperidol, clozapina e clozapina + D-serina. As proteínas comuns a esses tratamentos estão relacionadas principalmente à ubiquitinação, degradação pelo proteassomo, metabolismo de lipídios, e reparo de danos ao DNA. Os tratamentos com clozapina e haloperidol também modularam proteínas envolvidas no citoesqueleto de actina e sinalização por EIF2, processos alterados na esquizofrenia. Sendo assim, é possível que o tratamento com esses fármacos auxilie na normalização dessas vias, o que pode ter relação com os efeitos terapêuticos.

O tratamento com haloperidol modulou, dentre outras, proteínas envolvidas na síntese de selenocisteína, um aminoácido importante na constituição e função de enzimas envolvidas na proteção celular contra estresse oxidativo, como a glutathiona peroxidase, por exemplo. Neste contexto, o comprometimento da síntese de selenocisteína pode afetar o funcionamento dessas enzimas, contribuindo para um quadro de estresse oxidativo, relacionado ao desenvolvimento da discinesia tardia e outros efeitos colaterais característicos de antipsicóticos típicos.

Já o tratamento com clozapina modulou proteínas relacionadas ao metabolismo

(especialmente de mRNA e proteínas), resposta celular ao estresse, organização ou biogênese de componentes celulares, conjugação à ubiquitina, dentre outros. Ainda, observou-se a supra-regulação de proteínas *heat-shock*, tais como HSP70 e HSP90, e a modulação de proteínas envolvidas na proteção contra o estresse oxidativo, como a tioredoxina. A modulação dessas proteínas e vias pode estar relacionada aos efeitos terapêuticos da clozapina.

Ainda, a supra-regulação da cistationina- β -sintase (CBS), importante no metabolismo de homocisteína, pode estar envolvida na melhora dos sintomas relacionada à administração de D-serina em conjunto com clozapina. A supra-regulação desta enzima pode contribuir para a diminuição dos níveis de Hcy, que parecem estar diretamente relacionados à severidade dos sintomas negativos. Este pode ser um dos mecanismos envolvidos na melhora em testes que avaliam sintomas negativos e cognitivos em pacientes tratados com D-serina em associação com antipsicóticos, relatados por estudos anteriores. Ainda, é possível que o tratamento com clozapina + D-serina auxilie na normalização do metabolismo e níveis de compostos nitrogenados associados à esquizofrenia, o que pode estar relacionada à seus efeitos terapêuticos.

Nesse contexto, buscamos contribuir para o entendimento dos mecanismos bioquímicos e moleculares envolvidos na ação dessas drogas nos oligodendrócitos, e suas possíveis implicações na esquizofrenia, tanto no contexto terapêutico, quanto nos efeitos colaterais relacionados ao uso dos antipsicóticos. A partir desses dados, esperamos contribuir para o aprimoramento dos tratamentos já existentes e desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas, focadas nas vias e proteínas em questão.

8. PERSPECTIVAS

O desenvolvimento deste projeto contribuiu para o aprimoramento do modelo com a linhagem de oligodendrócitos humanos MO3.13, com a proposta de um protocolo de maturação dessas células. Isso contribuirá para novas abordagens relacionadas à maturação e desenvolvimento dos oligodendrócitos, e suas possíveis implicações na esquizofrenia. As células foram submetidas ao tratamento com um antipsicótico típico (haloperidol), um atípico (clozapina), e ao co-tratamento de clozapina com D-serina, relacionado a uma melhora no alívio de sintomas negativos. Os dados obtidos a partir desses tratamentos podem servir como base para o desenvolvimento de projetos de pesquisa com foco mais direcionado às alterações e vias específicas identificadas em nossos resultados. Dessa forma, este projeto e seus desdobramentos podem contribuir para a compreensão do mecanismo de ação dos antipsicóticos nos oligodendrócitos, e suas possíveis implicações na esquizofrenia.

Ainda, o artigo de revisão, escrito em conjunto com outros membros do laboratório, sob coordenação da Dra Valéria de Almeida, reuniu diversos achados e novas perspectivas para o estudo do sistema endocanabinóide na esquizofrenia, a partir de abordagens proteômicas e lipidômicas. Esse conjunto de informações pode nortear estudos futuros sobre a fisiopatologia da esquizofrenia sob a perspectiva do sistema endocanabinóide, assim como sobre possíveis abordagens terapêuticas relacionadas à esse sistema. Outra publicação decorrente do projeto é o capítulo referente ao protocolo de maturação da linhagem MO3.13.

O presente projeto também possibilitou a participação em congressos e eventos durante o período do mestrado: a 73rd SOBP Annual Meeting (em Nova Iorque) e o 1^o CannX Brasil (em São Paulo), além da Sao Paulo School of Advanced Science on Mass Spectrometry-based Proteomics (SPSAS-MS), organizada pelo Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM) em Campinas. Tais eventos foram de suma importância em minha formação enquanto cientista.

9. REFERÊNCIAS

- Adams J.C. Roles of fascin in cell adhesion and motility. *Curr Opin Cell Biol.* 2004, 16(5), 590-6.
- Adams J.C. Fascin-1 as a biomarker and prospective therapeutic target in colorectal cancer. *Expert Rev Mol Diagn.* 2015, 15(1), 41-8.
- Ahmad T., Aggarwal K., Pattnaik B., Mukherjee S., Sethi T., Tiwari B.K., Kumar M., Micheal A., Mabalirajan U., Ghosh B., Sinha Roy S., Agrawal A. Computational classification of mitochondrial shapes reflects stress and redox state. *Cell Death Dis.* 2013, 4, e461.
- Akanji A.O., Ohaeri J.U., Al-Shammri S.A., Fatania H.R. Associations of blood homocysteine concentrations in Arab schizophrenic patients. *Clin Biochem.* 2007, 40, 1026–1031.
- Allen K.M., Gleeson J.G., Bagrodia S., Partington M.W., MacMillan J.C., Cerione R.A., Mulley J.C., Walsh C.A. PAK3 mutation in nonsyndromic X-linked mental retardation. *Nat Genet.* 1998, 20, 25–30.
- Altar C.A., Jurata L.W., Charles V., Lemire A., Liu P., Bukhman Y., Young T.A., Bullard J., Yokoe H., Webster M.J., Knable M.B., Brockman J.A. Deficient hippocampal neuron expression of proteasome, ubiquitin, and mitochondrial genes in multiple schizophrenia cohorts. *Biol Psychiatry.* 2005, 58, 85–96.
- Altelaar A. F. M., Munoz J., Heck A. J. R. Next-generation proteomics: towards an integrative view of proteome dynamics. *Nat. Rev. Genet.* 2012, 14, 35–48.
- Andreasen N.C. Schizophrenia: the fundamental questions. *Brain Research Reviews.* 2000, 31(2-3), 106–112.
- Andrews G. L., Simons B. L., Young J. B., Hawkrige A. M., Muddiman D. C. Performance Characteristics of a New Hybrid Triple Quadrupole Time-of-Flight Tandem Mass Spectrometer. *Anal. Chem.* 2011, 83, 5442–5446.
- Andrews J.L., Goodfellow F.J., Matosin N., Snelling M.K., Newell K.A., Huang X.-F., Fernandez-Enright F. Alterations of ubiquitin related proteins in the pathology and development of schizophrenia: Evidence from human and animal studies. *Journal of Psychiatric Research.* 2017, 90, 31–39.
- Aquino A., Alexandrino G.L., Guest P.C., Augusto F., Gomes A.F., Murgu M., Steiner J., Martins-de-Souza D. Blood-based lipidomics approach to evaluate

biomarkers associated with response to olanzapine, risperidone, and quetiapine treatment in schizophrenia patients. *Front Psychiatry*. 2018, 9, 209.

- Aquino D.A., Klipfel A.A., Brosnan C.F., Norton W.T. The 70-kDa heat shock cognate protein (HSC70) is a major constituent of the central nervous system and is up-regulated only at the mRNA level in acute experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neurochem*. 1993, 61, 1340-1348.
- Banerjee R., Zou C.G. "Redox regulation and reaction mechanism of human cystathionine-beta-synthase: a PLP-dependent hemesensor protein". *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2005, 433(1), 144–56.
- Barch D.M., Ceaser A. Cognition in schizophrenia: core psychological and neural mechanisms. *Trends Cogn Sci*. 2012, 16, 27–34.
- Barroso-Chinea P., Thiolat M.L., Bido S., Martinez A., Doudnikoff E., Baufreton J., et al. D1 dopamine receptor stimulation impairs Intracellular compartment-specific proteasome dysfunction in postmortem cortex in schizophrenia subjects striatal proteasome activity in Parkinsonism through 26S proteasome disassembly. *Neurobiol Dis*. 2015, 78, 77–87.
- Bas A., Gultekin G., Incir S., Bas T.O., Emul M., Duran A. Level of serum thioredoxin and correlation with neurocognitive functions in patients with schizophrenia using clozapine and other atypical antipsychotics. *Psychiatry Research*. 2017, 247, 84–89.
- Behrens M.M., Ali S.S., Dao D.N., et al. Ketamine-induced loss of phenotype of fast-spiking interneurons is mediated by NADPH-oxidase. *Science*. 2007, 318, 1645–47.
- Behrens M.M., Sejnowski T.J. Does schizophrenia arise from oxidative dysregulation of parvalbumin interneurons in the developing cortex?. *Neuropharmacology*. 2009, 57, 193–200.
- Belvindrah R., Nissant A., Lledo P.M. Abnormal neuronal migration changes the fate of developing neurons in the postnatal olfactory bulb. *J Neurosci*. 2011, 31, 7551–7562.
- Bendikov I., Nadri C., Amar S., et al. A CSF and postmortem brain study of d-serine metabolic parameters in schizophrenia. *Schizophr Res*. 2007, 90(1), 41–51.

- Benitez M.J., Sanchez-Ponce D., Garrido J.J., Wandosell F. Hsp90 activity is necessary to acquire a proper neuronal polarization. *Biochem. Biophys. Acta.* 2014, *1843*, 245-252.
- Benn C.L., Farrell L.A., Cha J.H. Neurotransmitter receptor analysis in transgenic mouse models. *Methods Mol. Biol.* 2004, *277*, 231-260.
- Bernstein H.G., Steiner J., Guest P.C, Dobrowolny H., Bogerts B. Glial cells as key players in schizophrenia pathology: recent insights and concepts of therapy. *Schizophrenia Research.* 2015, *161* (1), 4-18.
- Bhambhani HP, Mueller TM, Simmons MS, Meador-Woodruff JH. Actin polymerization is reduced in the anterior cingulate cortex of elderly patients with schizophrenia. *Transl Psychiatry.* 2017, *7*(12), 1278.
- Bitanhirwe B.K., Woo T.U.W. Oxidative stress in schizophrenia: an integrated approach. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2011, *35*(3), 878–893.
- Bjorkhem I., Meaney S. Brain cholesterol: long secret life behind a barrier. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004, *24*, 806–15.
- Bošković M., Vovk T., Kores Plesničar B., Grabnar I. Oxidative stress in schizophrenia. *Curr Neuropharmacol.* 2011, *9*, 301–312.
- Bousman C.A., Luza S., Mancuso S.G., Kang D., Opazo C.M., Mostaid M.S., Cropley V., McGorry P., Shannon Weickert C., Pantelis C., Bush A.I., Everall I.P. Elevated ubiquitinated proteins in brain and blood of individuals with schizophrenia. *Sci Rep.* 2019, *9*(1), 2307.
- Brandão-Teles C., de Almeida V., Cassoli J.S., Martins-de-Souza D. Oligodendrocytes: Potential of Discovering New Treatment Targets. *Front Pharmacol.* 2019, *10*, 186. Erratum in: *Front Pharmacol.* 2019, *10*, 344.
- Brouwer A., Luykx J.J., van Boxmeer L., Bakker S.C., Kahn R.S. NMDA-receptor coagonists in serum, plasma, and cerebrospinal fluid of schizophrenia patients: a meta-analysis of case-control studies. *Neurosci Biobehav Rev.* 2013, *37*(8), 1587–1596.
- Brown A., Bottiglieri T., Schaefer C., Quesenberry C., Liu L., Bresnahan M. Susser E. Elevated prenatal homocysteine levels as a risk factor for schizophrenia. *Arch. Gen. Psychiatry.* 2007, *64*, 31-39.
- Brown A.S. The environment and susceptibility to schizophrenia. *Prog Neurobiol.* 2011, *93*, 23–58.

- Brown A.S. Epidemiologic studies of exposure to prenatal infection and risk of schizophrenia and autism. *Dev Neurobiol.* 2012, 72, 1272–76.
- Bruins A. P. Mechanistic aspects of electrospray ionization. *Journal of Chromatography A.* 1998, 794 (1–2), 345–357.
- Buntinx M., Vanderlocht J., Hellings N., Vandenabeele F., Lambrichts I., Raus J., Steels P. Characterization of three human oligodendroglial cell lines as a model to study oligodendrocyte injury: Morphology and oligodendrocyte-specific gene expression. *Journal of Neurocytology.* 2003, 32(1), 25–38.
- Burnet P.W.J., Eastwood S.L., Bristow G.C., et al. D-Amino acid oxidase (DAO) activity and expression are increased in schizophrenia. *Mol Psychiatry.* 2008, 13(7), 658.
- Byne W., Kiskindene S., Tatusov A., Yiannoulos G., Buchsbaum M.S., Haroutunian V. Schizophrenia-associated reduction of neuronal and oligodendrocyte numbers in the anterior principal thalamic nucleus. *Schizophr Res.* 2006, 85, 245–253.
- Cabungcal J.H., Counotte D.S., Lewis E.M., et al. Juvenile antioxidant treatment prevents adult deficits in a developmental model of schizophrenia. *Neuron.* 2014, 83, 1073–84.
- Calcia M.A., Madeira C., Alheira F.V., et al. Plasma levels of D-serine in Brazilian individuals with schizophrenia. *Schizophr Res.* 2012, 142(1–3), 83–87.
- Cannon M., Kendell R., Susser E., Jones P. Prenatal and perinatal risk factors for schizophrenia. In: Murray RM, Jones PB, Susser E, Van Os J, Cannon M, eds. *The epidemiology of schizophrenia.* Cambridge: Cambridge University Press, 2003, 74–99.
- Caldeira M.V., Curcio M., Leal G., Salazar I.L., Mele M., Santos A.R., et al. Excitotoxic stimulation downregulates the ubiquitinproteasome system through activation of NMDA receptors in cultured hippocampal neurons. *Biochim Biophys Acta.* 2013, 1832, 263–74.
- Carlsson A., Lindqvist M. Effect of chlorpromazine or haloperidol on formation of 3-methoxytyramine and normetanephrine in mouse brain. *Acta Pharmacol. Toxicol.* 1963, 20, 140–144.
- Carter C.J. EIF2B and oligodendrocyte survival: where nature and nurture meet in bipolar disorder and schizophrenia? *Schizophr. Bull.* 2007, 33, 1343–1353.

- Cassoli J.S., Guest P.C., Malchow B., Schmitt A., Falkai P., Martins-de-Souza D. Disturbed macro-connectivity in schizophrenia linked to oligodendrocyte dysfunction: from structural findings to molecules. *Npj Schizophrenia*. 2015, 1, 15034.
- Cassoli J.S., Iwata K., Steiner J., Guest P.C., Turck C.W., Nascimento J.M., Martins-de-Souza D. Effect of MK-801 and Clozapine on the Proteome of Cultured Human Oligodendrocytes. *Front. Cell. Neurosci*. 2016, 10, 52.
- Castillo R.I., Rojo L.E., Henriquez-Henriquez M., Silva H., Maturana A., Villar M.J., Fuentes M., Gaspar P.A. From molecules to the clinic: Linking schizophrenia and metabolic syndrome through sphingolipids metabolism. *Front. Neurosci*. 2016, 10, 488.
- Checler F., da Costa C.A., Ancolio K., Chevallier N., Lopez-Perez E., Marambaud P. "Role of the proteasome in Alzheimer's disease". *Biochimica et Biophysica Acta*. 2000, 1502(1), 133–8.
- Cho C.H., Lee H.J. Oxidative stress and tardive dyskinesia: Pharmacogenetic evidence. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2013, 46, 207-213.
- Cho S.E., Na K.S., Cho S.J., Kang S.G. Low d-serine levels in schizophrenia: A systematic review and meta-analysis. *Neuroscience Letters*. 2016, 634, 42-51.
- Choo Y.S., Vogler G., Wang D., Kalvakuri S., Iliuk A., Tao W.A., et al. Regulation of parkin and PINK1 by neddylation. *Hum Mol Genet*. 2012, 21, 2514–2523.
- Chung K.K., Dawson V.L., Dawson T.M. "The role of the ubiquitin-proteasomal pathway in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders". *Trends in Neurosciences*. 2001, 24(11), 7–14.
- Cohen G., Hochstein P. Glutathione peroxidase: The primary agent for the elimination of hydrogen peroxide in erythrocytes. *Biochemistry*. 1963, 2, 1420–8.
- Coyle J.T. Glutamate and schizophrenia: beyond the dopamine hypothesis. *Cell. Mol. Neurobiol*. 2006, 26 (4–6), 365-384.
- Cravatt B. F., Simon G. M., Yates, J. R. The biological impact of mass-spectrometry-based proteomics. *Nature*. 2007, 450, 991–1000.
- Dakhale G., Khanzode S., Khanzode S., Saoji A., Khobragade L., Turankar A. Oxidative damage and schizophrenia: the potential benefit by atypical antipsychotics. *Neuropsychobiology*. 2004, 49, 205–209.

- Dansen T.B., Westerman J., Wouters F., Wanders R.J., van Hoek A., Gadella T.W., Wirtz K.W. High affinity binding of very long chain fatty acyl CoA esters to the peroxisomal non-specific lipid transfer protein (sterol carrier protein-2). *Biochem J.* 1999, 339, 193–199.
- De Koning T.J., Klomp L.W. Serine-deficiency syndromes. *Curr Opin Neurol.* 2004, 17(2), 197–204.
- De Lau, L. M. L., Smith, A. D., Refsum, H., Johnston, C., & Breteler, M. M. B. (2009). Plasma vitamin B12 status and cerebral white-matter lesions. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 80(2), 149–157. - Elevated homocysteine has been associated with a higher prevalence of cerebral white-matter lesions and infarcts, and worse cognitive performance.
- Dietrich-Muszalska A., Malinowska J., Olas B., Glowacki R., Bald E., Wachowicz B., Rabe-Jablonska J. The oxidative stress may be induced by the elevated homocysteine in schizophrenic patients. *Neurochem. Res.* 2012, 37, 1057-1062.
- Dietrich-Muszalska A., Olas B., Głowacki R., Bald E. Oxidative/Nitrative Modifications of Plasma Proteins and Thiols from Patients with Schizophrenia. *Neuropsychobiology.* 2009, 59(1), 1–7.
- Dietschy J.M. Central nervous system: cholesterol turnover, brain development and neurodegeneration. *Biol Chem.* 2009, 390, 287–93.
- Distler U., Kuharev J., Navarro P., Levin Y., Schild H., Tenzer S. Drift time-specific collision energies enable deep-coverage data-independent acquisition proteomics. *Nature methods.* 2014, 11, 167-170.
- Djakovic S.N., Marquez-Lona E.M., Jakawich S.K., Wright R., Chu C., Sutton M.A., et al. Phosphorylation of Rpt6 regulates synaptic strength in hippocampal neurons. *J Neurosci.* 2012, 32, 5126–31.
- Do K.Q., Cabungcal J.H., Frank A., Steullet P., Cuenod M. Redox dysregulation, neurodevelopment, and schizophrenia. *Curr Opin Neurobiol.* 2009, 19, 220–30.
- Domon B., Gallien S. Recent advances in targeted proteomics for clinical applications. *PROTEOMICS – Clin. Appl.* 2015, 9, 423–431.
- Dominguez R., Holmes K.C. Actin structure and function. *Ann. Rev. Biophys.* 2011, 40, 169–186.

- El-Tallawy H.N., Saleem T.H., El-Ebidi A.M., et al. Clinical and biochemical study of d-serine metabolism among schizophrenia patients. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2017, *13*, 1057–1063.
- Erturk A., Wang Y., Sheng M. Local pruning of dendrites and spines by caspase-3-dependent and proteasome-limited mechanisms. *J Neurosci.* 2014, *34*, 1672–88.
- Fang F., Zhang H., Zhang Y., Xu H., Huang Q., Adilijiang A., Wang J., Zhang Z., Zhang D., Tan Q., He J., Kong L., Liu Y. Antipsychotics promote the differentiation of oligodendrocyte progenitor cells by regulating oligodendrocyte lineage transcription factors 1 and 2: Antipsychotics promote the differentiation of oligodendrocyte progenitor cells by regulating oligodendrocyte lineage transcription factors 1 and 2. *Life Sciences.* 2013, *93*, 429-434.
- Fatemi S.H., Folsom T.D. The neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia, revisited. *Schizophr Bull.* 2009, *35*, 528–48.
- Feng L.G., Song Z.W, Xin F., Hu J. Association of plasma homocysteine and methylenetetrahydrofolate reductase C677T gene variant with schizophrenia: a Chinese Han population-based case-control study. *Psychiatry Res.* 2009, *168*, 205-208.
- Fenn J. B., Mann, M., Meng C. K., Wong S. F., Whitehouse, C. M. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science.* 1989, *246*, 64–71.
- Ferno J., Skrede S., Vik-Mo A.O., Havik B., Steen V.M. Drug-induced activation of SREBP-controlled lipogenic gene expression in CNS-related cell lines: marked differences between various antipsychotic drugs. *BMC Neurosci.* 2006, *7*, 69.
- Ferreira J.S., Schmidt J., Rio P., Aguas R., Rooyackers A., Li K.W., et al. GluN2B-containing NMDA receptors regulate AMPA receptor traffic through anchoring of the synaptic proteasome. *J Neurosci.* 2015, *35*, 8462–79.
- Flippo K.H., Strack S. An emerging role for mitochondrial dynamics in schizophrenia. *Schizophrenia Research.* 2017, *187*, 26–32.
- Flohe L., Günzler W.A., Schock H.H. Glutathione peroxidase: A selenoenzyme. *FEBS Lett.* 1973, *32*(1), 132–4.
- Fukuzako H., Kodama S. Changes in levels of phosphorus metabolites in temporal lobes of drug-naive schizophrenic patients. *Am J Psychiatry.* 1999, *4*, 1205–1208.

- Gjessing, R. Disturbances of somatic functions in catatonia with a periodic course, and their compensation. *J. Ment. Sci.* 1938, *84*, 608.
- Glausier J.R., Lewis D.A. Dendritic spine pathology in schizophrenia. *Neuroscience*. 2013, *22*, 90–107.
- Goff D.C., Bottiglieri T., Arning E. Folate, homocysteine and negative symptoms in schizophrenia. *Am J Psychiatry*. 2004, *161*, 1705–1708.
- Gonzalez-Flores J.N., Shetty S.P., Dubey A., Copeland P.R. The molecular biology of selenocysteine. *Biomolecular concepts*. 2013, *4*(4), 349-65.
- Ghosh S., Dyer R.A., Beasley C.L. Evidence for altered cell membrane lipid composition in postmortem prefrontal white matter in bipolar disorder and schizophrenia. *Journal of Psychiatric Research*. 2017, *95*, 135-142.
- Green M.J., Matheson S.L., Shepherd A., Weickert C.S., Carr V.J. Brainderived neurotrophic factor levels in schizophrenia: a systematic review with meta-analysis. *Mol Psychiatry*. 2011, *16*, 960–72.
- Guest P.C., Iwata K., Kato T.a., Steiner J., Schmitt A., Turck C. W., Martins-de-Souza, D. MK-801 treatment affects glycolysis in oligodendrocytes more than in astrocytes and neuronal cells: insights for schizophrenia. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2015, *9*, 180.
- Haas K.F., Broadie K. Roles of ubiquitination at the synapse. *Biochim Biophys Acta*. 2008, *1779*, 495–506.
- Hackenbrock C.R. Ultrastructural bases for metabolically linked mechanical activity in mitochondria; II electron transport-linked ultrastructural transformations in mitochondria. *J. Cell Biol.* 1968, *37*(2), 345–369.
- Haidemenos A., Kontis D., Gazi A., Kallai E., Allin M., Lucia B. Plasma homocysteine folate and B12 in chronic schizophrenia. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*. 2007, *31*, 1289-1296.
- Halim N.D., Weickert C.S., McClintock B.W., Weinberger D.R., Lipska B.K. Effects of chronic haloperidol and clozapine treatment on neurogenesis in the adult rat hippocampus. *Neuropsychopharmacology*. 2004, *29*, 1063–1069.
- Hall J., Trent S., Thomas K.L., O'Donovan M.C., Owen M.J. Genetic risk for schizophrenia: convergence on synaptic pathways involved in plasticity. *Biol Psychiatry*. 2015, *77*, 52–58.

- Hamilton A.M., Oh W.C., Vega-Ramirez H., Stein I.S., Hell J.W., Patrick G.N., et al. Activity-dependent growth of new dendritic spines is regulated by the proteasome. *Neuron*. 2012, 74, 1023–30.
- Harrison P.J., Weinberger D.R. Schizophrenia genes, gene expression, and neuropathology: on the matter of their convergence. *Mol. Psychiatry*. 2004, 10, 40–68.
- Harrison P.J. Recent genetic findings in schizophrenia and their therapeutic relevance. *Journal of Psychopharmacology*. 2015, 29(2), 85–96.
- Hashimoto K., Fukushima T., Shimizu E., et al. Decreased serum levels of D-serine in patients with schizophrenia: evidence in support of the N-methyl-D-aspartate receptor hypofunction hypothesis of schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry*. 2003, 60(6), 572–576.
- Hashimoto K., Engberg G., Shimizu E., Nordin C., Lindström L.H., Iyo M. Reduced d-serine to total serine ratio in the cerebrospinal fluid of drug naive schizophrenic patients. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry*. 2005, 29(5), 767-769.
- Hashimoto K., Malchow B., Falkai P., Schmitt, A. Glutamate modulators as potential therapeutic drugs in schizophrenia and affective disorders. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*. 2013, 263(5), 367–377.
- Hashimoto Y., Kim D.J., Adams J.C. The roles of fascin in health and disease. *J Pathol*. 2011, 224(3), 289-300.
- Hayashi-Takagi A., Takaki M., Graziane N., Seshadri S., Murdoch H., Dunlop A.J., Makino Y., Seshadri A.J., Ishizuka K., Srivastava D.P., Xie Z., Baraban J.M., Houslay M.D., Tomoda T., Brandon N.J., Kamiya A., Yan Z., Penzes P., Sawa A. Disrupted-in-Schizophrenia 1 (DISC1) regulates spines of the glutamate synapse via Rac1. *Nat Neurosci*. 2010, 13, 327–332.
- He Y., Yu Z., Giegling I., Xie L., Hartmann A.M., Prehn C., Adamski J., Kahn R., Li Y., Illig T., Wang-Sattler R., Rujescu D. Schizophrenia shows a unique metabolomics signature in plasma. *Transl Psychiatry*. 2012, 2, e149.
- Heresco-Levy U., Javitt D.C., Ebstein R., Vass A., Lichtenberg P., Bar G., Catinari S., Ermilov M. D-serine efficacy as add-on pharmacotherapy to risperidone and olanzapine for treatment-refractory schizophrenia. *Biol. Psychiatry*. 2005, 57, 577-585.

- Hill J.J., Hashimoto T., Lewis D.A. Molecular mechanisms contributing to dendritic spine alterations in the prefrontal cortex of subjects with schizophrenia. *Mol Psychiatry*. 2006, 11, 557–566.
- Ho P.I., Ortiz D., Rogers E., Shea T.B. Multiple aspects of homocysteine neurotoxicity: glutamate excitotoxicity, kinase hyperactivation and DNA damage. *J. Neurosci. Res*. 2002, 70, 694-702.
- Hof P.R., Haroutunian V., Friedrich V.L. Jr, Byne W., Buitron C., Perl D.P. *et al*. Loss and altered spatial distribution of oligodendrocytes in the superior frontal gyrus in schizophrenia. *Biol Psychiatry*. 2003, 53, 1075–1085.
- Hoffmann E., Stroobant V. *Mass Spectrometry Principles and Applications*. 3^a edição. England: John Wiley & Sons Ltd, 2007.
- Holmgren A. Thioredoxin. *Annu Rev. Biochem*. 1985, 54(1), 237–271.
- Hons J., Zirko R., Ulrychova M., Cermakova E., Libigerd J. Serine serum levels in patients with schizophrenia: relation to psychopathology and comparison to healthy subjects. *Neuro Endocrinol. Lett*. 2008, 29 (4), 485-492.
- Horiike K., Tojo H., Arai R., Nozaki M., Maeda T. D-amino-acid oxidase is confined to the lower brain stem and cerebellum in rat brain: regional differentiation of astrocytes. *Brain Res*. 1994, 652(2), 297–303.
- Horn M.R.V., Sild M., Ruthazer E.S. D-serine as a gliotransmitter and its roles in brain development and disease. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2013, 7(39).
- Horrobin D.F., Glen A.I.M., Vaddadi K. The membrane hypothesis of schizophrenia. *Schizophr Re*. 1994, 13, 195–207.
- Howes O.D., Murray R.M. Schizophrenia: an integrated sociodevelopmental-cognitive model. *Lancet*. 2014, 383, 1677–87.
- Huang N., Cao B., Brietzke E., Park C., Cha D., Pan Z., Zhu J., Yagiong L., Qing X., Jing Z., McIntyre R.S., Jingyu W., Yan L. A pilot case-control study on the association between N-acetyl derivatives in serum and first-episode schizophrenia. *Psychiatry Research*. 2019, 272, 36–41.
- Insel T.R. Rethinking schizophrenia. *Nature*. 2010, 468 (7321), 187-193.
- Ishima T., Iyo M., Hashimoto K. Neurite outgrowth mediated by the heat shock protein Hsp90 α : a novel target for the antipsychotic drug aripiprazole. *Transl. Psychiatry*. 2012, 2, e170.

- Iwata K., Café-Mendes C.C., Schmitt A., Steiner J., Manabe T., Matsuzaki H., Martins-de Souza, D. The human oligodendrocyte proteome. *Proteomics*. 2013, 13(23-24), 3548–3553.
- Javitt D.C. Current and emergent treatments for symptoms and neurocognitive impairment in schizophrenia. *Curr. Treat. Options Psychiatry*. 2015, 1(2), 107-120.
- Jentsch J.D., Roth R.H. The neuropsychopharmacology of phencyclidine: from NMDA receptor hypofunction to the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*. 1999, 20, 201–225.
- Jeste D.V., Caligiuri M.P. Tardive dyskinesia. *Schizophr Bull*. 2003, 19, 303-315.
- Jhee K.H., Kruger W.D. "The role of cystathionine beta-synthase in homocysteine metabolism". *Antioxidants & Redox Signaling*. 2005, 7 (5–6), 813–22.
- Ji K., Miyauchi J., Tsirka S.E. Microglia: an active player in the regulation of synaptic activity. *Neural Plast* 2013. 2013, 627325.
- Joshi R.S., Panicker M.M. Identifying the In Vivo Cellular Correlates of Antipsychotic Drugs. *ENeuro*. 2018, 5(5), ENEURO.0220-18.2018.
- Kahn R.S., Sommer I.E., Murray R.M., Meyer-Lindenberg A., Weinberger D.R., Cannon T.D., O'Donovan M., Correll C.U., Kane J.M., van OS J., Insel T.R. Schizophrenia. *Nature Reviews Disease Primers*. 2015, 1, 15067.
- Kaiser S., Foltz L. A., George C. A., Kirkwood S.C., Bemis K.G., Lin X., Nisenbaum L.K. Phencyclidine-induced changes in rat cortical gene expression identified by microarray analysis: implications for schizophrenia. *Neurobiology of Disease*. 2004, 16(1), 220–35.
- Kale A., Naphade N., Sapkale S., Kamaraju M., Pillai A., Joshi S., Mahadik S. Reduced folic acid, vitamin B12 and docosahexaenoic acid and increased homocysteine and cortisol in never-medicated schizophrenia patients: implications for altered one-carbon metabolism. *Psychiatry Res*. 2010, 175, 47-53.
- Kane J.M., Woerner M., Lieberman J. Tardive dyskinesia: prevalence, incidence, and risk factors. *J Clin Psychopharmacol*. 1988, 8, 52S-56S.
- Kaneta H., Ukai W., Tsujino H., Furuse K., Kigawa Y., Tayama M., Ishii T., Hashimoto E., Kawanishi C. Antipsychotics promote GABAergic interneuron genesis in the adult rat brain: Role of heat-shock protein production. *Journal of Psychiatric Research*. 2017, 92, 108–118.

- Kantrowitz J.T., Javitt D.C. N-methyl-d-aspartate (NMDA) receptor dysfunction or dysregulation: the final common pathway on the road to schizophrenia? *Brain Res Bull.* 2010, *83*, 108–21.
- Kantrowitz J.T. , Woods S.W., Petkova E., Cornblatt B., Corcoran C.M., Chen H., Silipo G., Javitt D.C. D-serine for the treatment of negative symptoms in individuals at clinical high risk of schizophrenia: a pilot, double-blind, placebo-controlled, randomised parallel group mechanistic proof-of-concept trial. *Lancet Psychiatry.* 2015, *2*, 403-412.
- Kantrowitz J.T., Epstein M.L., Beggel O., Rohrig S., Lehrfeld J.M., Revheim N., Lehrfeld N.P., Reep J., Parker E., Silipo G., Ahissar M., Javitt D.C. Neurophysiological mechanisms of cortical plasticity impairments in schizophrenia and modulation by the NMDA receptor agonist d-serine. *Brain.* 2016, *139* (12), 3281-3295.
- Kantrowitz J.T., Epstein M.L., Lee M., Lehrfeld N., Nolan K.A., Shope C., Petkova E., Silipo G., Javitt D.C. Improvement in mismatch negativity generation during d-serine treatment in schizophrenia: Correlation with symptoms. *Schizophrenia Research.* 2018, *191*, 70-79.
- Karas M., Ingendoh A., Bahr U., Hillenkamp F. Ultraviolet-Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry of Femtomolar Amounts of Large Proteins. *Biomed. Mass Spectrom.* 1989, *18*, 841.
- Kee Y., Huang M., Chang S., Moreau L.A., Park E., Smith P.G., et al. Inhibition of the Nedd8 system sensitizes cells to DNA interstrand cross-linking agents. *Mol Cancer Res.* 2012, *10*, 369–377.
- Khandaker G.M., Zimbron J., Lewis G., Jones P.B. Prenatal maternal infection, neurodevelopment and adult schizophrenia: a systematic review of population-based studies. *Psychol Med.* 2013, *43*, 239–57.
- Khashan A.S., Abel K.M., McNamee R., et al. Higher risk of off spring schizophrenia following antenatal maternal exposure to severe adverse life events. *Arch Gen Psychiatry.* 2008, *65*, 146–52.
- Kim J.S., Kornhuber H.H., Schmid-Burgk W., Holzmüller B. Low cerebrospinal fluid glutamate in schizophrenic patients and a new hypothesis on schizophrenia. *Neuroscience Letters.* 1980, *20* (3), 379-382.

- Kleiger G., Mayor T. "Perilous journey: a tour of the ubiquitin-proteasome system". *Trends in Cell Biology*. 2014, 24(6), 352–9.
- Kodama M., Fujioka T., Duman R.S. Chronic olanzapine or fluoxetine administration increases cell proliferation in hippocampus and prefrontal cortex of adult rat. *Biol Psychiatry*. 2004, 56, 570–580.
- Konradi C., Öngür, D. Role of mitochondria and energy metabolism in schizophrenia and psychotic disorders. *Schizophrenia Research*. 2017, 187, 1–2.
- Krebs M.O., Bellon A., Mainguy G., Jay T.M., Frieling H. One-carbon metabolism and schizophrenia: current challenges and future directions. *Trends Mol. Med*. 2009, 15, 562-570.
- Kriisa K., Leppik L., Balõtšev R., Ottas A., Soomets U., Koido K., Volke V., Innos J., Haring L., Vasar E., Zilmer M. Profiling of acylcarnitines in first episode psychosis before and after antipsychotic treatment. *J Proteome Res*. 2017, 16, 3558–3566.
- Kruman I.I., Culmsee C., Chan S.L., Kruman Y., Guo Z.H., Penix L.R., Mattson M.P. Homocysteine elicits a DNA damage response in neurons that promotes apoptosis and hypersensitivity to excitotoxicity. *J. Neurosci*. 2000, 20, 6920-6926.
- Kryukov G.V., Castellano S., Novoselov S.V., Lobanov A.V., Zehab O., Guigó R., Gladyshev V.N. Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science*. 2003, 300(5624), 1439–43.
- Ksir C., Hart C.L. Cannabis and Psychosis: a Critical Overview of the Relationship. *Curr Psychiatry Rep*. 2016, 18(2), 12.
- Lane H.Y., Lin C.H., Huang Y.J., Liao C.H., Chang Y.C., Tsai G.E. A random-ized, double-blind, placebo-controlled comparison study of sarcosine (N-methylglycine) and D-serine add-on treatment for schizophrenia. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2010, 13(4), 451–460.
- Lange Y. Tracking cell cholesterol with cholesterol oxidase. *J Lipid Res*. 1992, 33, 315–21.
- Laruelle M., Kegeles L.S., Abi-dargham A. Glutamate, Dopamine, and Schizophrenia. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2003, 1003, 138-158.

- Legros F., Lombès A., Frachon P., Rojo M. Mitochondrial fusion in human cells is efficient, requires the inner membrane potential, and is mediated by mitofusions. *Mol. Biol. Cell.* 2002, *13*(12), 4343–4354.
- Leppik L., Parksepp M., Janno S, Koido K., Haring L., Vasar E., Zilmer M. Profiling of lipidomics before and after antipsychotic treatment in first-episode psychosis. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 2019, 940-1334.
- Leucht S., Heres S. Epidemiology, clinical consequences, and psychosocial treatment of nonadherence in schizophrenia. *Journal of Clinical Psychiatry.* 2006, *67*(5), 3–8.
- Leucht S., Corves C., Arbter D., Engel R. R., Li C., Davis J.M. Second-generation versus first-generation antipsychotic drugs for schizophrenia: a meta-analysis. *The Lancet.* 2009, *373*(9657), 31–41.
- Levin Y., Hradetzky E., Bahn, S. Quantification of proteins using data-independent analysis (MS E) in simple and complex samples: A systematic evaluation. *Proteomics.* 2011, *11* (16), 3273–3287.
- Levine J., Stahl Z., Sela B.A. Homocysteine-reducing strategies improve symptoms in chronic schizophrenia patients with hyperhomocysteinemia. *Biol Psychiatry.* 2006, *60*, 265–269.
- Lewis D.A., Lieberman J.A. Catching up on schizophrenia: natural history and neurobiology. *Neuron.* 2000, *28*(2), 325–334.
- Li C., Xiao L., Liu X., Yang W., Shen W., Hu C., Yang G., He C. A functional role of NMDA receptor in regulating the differentiation of oligodendrocyte precursor cells and remyelination. *Glia.* 2013, *61*, 732–749.
- Li Y., Sacchi S., Pollegioni L., Basu A.C., Coyle J.T., Bolshakov V.Y. Identity of endogenous NMDAR glycine site agonist in amygdala is determined by synaptic activity level. *Nat Commun.* 2013, *4*, 1760.
- Lin G.N., Corominas R., Lemmens I., Yang X., Tavernier J., Hill D.E., Vidal M., Sebat J., Iakoucheva L.M. Spatiotemporal 16p11.2 protein network implicates cortical late mid-fetal brain development and KCTD13-Cul3-RhoA pathway in psychiatric diseases. *Neuron.* 2015, *85*, 742–754.
- Lipska B.K., Weinberger D.R. To model a psychiatric disorder in animals: schizophrenia as a reality test. *Neuropsychopharmacology.* 2000, *23*, 223–239.

- Lipton S.A., Kim W.K., Choi Y.B., Kumar S., D'emilia D.M., Rayudu P.V., Arnelle D.R., Stamler J.S. Neurotoxicity associated with dual actions of homocysteine at the N-methyl-D-aspartate receptor. *Neurobiology*. 1997, 94, 5923-5928.
- Liu J., Su H., Wang X. The COP9 signalosome coerces autophagy and the ubiquitin-proteasome system to police the heart. *Autophagy*. 2015, 12(3), 601–602.
- Lohr J.B., Kuczenski R., A.B. Niculescu. Oxidative mechanisms and tardive dyskinesia. *CNS Drugs*. 2003, 17, 47-62.
- Loones M.T., Chang Y., Morange M. The distribution of heat shock proteins in the nervous system of the unstressed mouse embryo suggests a role in neuronal and non-neuronal differentiation. *Cell Stress Chaperones*. 2000, 5, 291-305.
- Luo W., Sun W., Taldone T., Rodina A., Chiosis G. Heat shock protein 90 in neurodegenerative diseases. *Mol. Neurodegener*. 2010, 5, 24.
- Ma Y.Y., Shek C.C., Wong M.C.K., Yip K.C., Ng R.M.K., Nguyen D.G.H., Poon T.K. Homocysteine Level in Schizophrenia Patients. 2009, 43(8), 760-765.
- Madeira C., Freitas M.E., Vargas-Lopes C., Wolosker H., Panizzutti R. Increased brain D-amino acid oxidase (DAAO) activity in schizophrenia. *Schizophr Res*. 2008, 101(1–3), 76–83.
- Man E.B., Bettcher P.G., Brown W.T. Variations in plasma-amino acid nitrogen of schizophrenics. *Yale J Biol Med*. 194, 20(2), 167-74.
- Martin G.G., Chung S., Landrock D., Landrock K.K., Huang H., Dangott L.J., Peng X., Kaczocha M., Seeger D.R., Murphy E.J., Golovko M.Y., Kier A.B., Schroeder F. FABP1 gene ablation impacts brain endocannabinoid system in male mice. *J Neurochem*. 2016, 138, 407–422.
- Martins M.R., Petronilho F.C., Gomes K.M., Dal-Pizzol F., Streck E.L., Quevedo J. Antipsychotic-induced oxidative stress in rat brain. *Neurotox Res*. 2008, 13, 63–69.
- Martins de Souza D., de Oliveira B. M., Farias, A.S., Horiuchi R.S., Domingues C. C., de Paula E., Marangoni S, Gattaz W.F., Dias-Neto E., Novello J.C. The use of ASB-14 in combination with CHAPS is the best for solubilization of human brain proteins for two-dimensional gel electrophoresis. *Briefings in Functional Genomics and Proteomics*. 2007, 6(1), 70–75.
- Martins-de-Souza D., Guest P.C., Vanattou-Saifoudine N., Wesseling H., Rahmoune H., Bahn S. The need for phosphoproteomic approaches in psychiatric research. *Journal of Psychiatric Research*. 2011, 45(2015), 1404–1406.

- Martins-de-Souza D., Lebar M., Turck, C. W. Proteome analyses of cultured astrocytes treated with MK-801 and clozapine: similarities with schizophrenia. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*. 2011, 261(3), 217–228.
- Matsumoto J., Sugiura Y., Yuki D., Hayasaka T., Goto-Inoue N., Zaima N., Kunii Y., Wada A., Yang Q., Nishiura K., Akatsu H., Hori A., Hashizume Y., Yamamoto T., Ikemoto K., Setou M., Niwa S. Abnormal phospholipids distribution in the prefrontal cortex from a patient with schizophrenia revealed by matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*. 2011, 400, 1933.
- Mauch D.H., Nagler K., Schumacher S., et al. CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol. *Science*. 2001, 294, 1354–7.
- Mayer R.J. "From neurodegeneration to neurohomeostasis: the role of ubiquitin". *Drug News & Perspectives*. 2003, 16(2), 103–8.
- McEvoy J., Baillie R.A., Zhu H., Buckley P., Keshavan M.S., Nasrallah H.A., Dougherty G.G., Yao J.K., Kaddurah-Daouk R. Lipidomics reveals early metabolic changes in subjects with schizophrenia: effects of atypical antipsychotics. *PLoS One*. 2013, 8, e68717.
- McGrath J.J., Eyles D.W., Pedersen C.B., et al. Neonatal vitamin D status and risk of schizophrenia: a population-based case–control study. *Arch Gen Psychiatry*. 2010, 67, 889–94.
- Melo-Braga M., Ibáñez-Vea M., Larsen M., Kulej K. Comprehensive Protocol to Simultaneously Study Protein Phosphorylation, Acetylation, and N-Linked Sialylated Glycosylation. In: Posch A, editor. *Proteomic Profiling. Methods in Molecular Biology*. 1295: Springer New York; 2015. p. 275-92.
- Meltzer H.Y. Clinical studies on the mechanism of action of clozapine: the dopamine–serotonin hypothesis of schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl)*. 1989, 99 (suppl), S18–27.
- Middleton F.A., Mirnics K., Pierri J.N., Lewis D.A., Levitt P. Gene expression profiling reveals alterations of specific metabolic pathways in schizophrenia. *J Neurosci*. 2002, 22, 2718–2729.
- Milligan S., Martin G.G., Landrock D., McIntosh A. L., Mackie J. T., Schroeder F., Kier A.B. Ablating both Fabp1 and Scp2/Scpx (TKO) induces hepatic phospholipid

and cholesterol accumulation in high fat-fed mice. *Biochimica et biophysica acta. Molecular and cell biology of lipids*. 2018, 1863(3), 323–338.

- Misiak B., Frydecka D., Slezak R., Piotrowski P., Kiejna A. Elevated homocysteine level in first-episode schizophrenia patients-the relevance of family history of schizophrenia and lifetime diagnosis of cannabis abuse. *Metab. Brain Dis.* 2014, 29, 661-670.
- Misiak B., Stanczykiewicz B., Laczmanski L., Frydecka D. Lipid profile disturbances in antipsychotic-naive patients with first-episode non-affective psychosis: A systematic review and meta-analysis. *Schizophr. Res.* 2017, 190, 18-27.
- Miyoshi Y., Hamase K., Okamura T., Konno R., Kasai N., Tojo Y., Zaitso K. Simultaneous two-dimensional HPLC determination of free d-serine and d-alanine in the brain and periphery of mutant rats lacking d-amino-acid oxidase. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 2011, 879, 3184-3189.
- Moghaddam B., Javitt D. From revolution to evolution: the glutamate hypothesis of schizophrenia and its implication for treatment. *Neuropsychopharmacology*. 2012, 37, 4–15.
- Molina V., Sanchez J., Sanz J., Reig S., Benito C., Leal I., Sarramea F., Rebolledo R., Palomo T., Desco M. Dorsolateral prefrontal N-acetyl-aspartate concentration in male patients with chronic schizophrenia and with chronic bipolar disorder. *Eur. Psychiatry*. 2007, 22(8), 505–512.
- Moyer C.E., Shelton M.A., Sweet R.A. Dendritic spine alterations in schizophrenia. *Neurosci Lett*. 2015, 601, 46–53.
- Mueser K. T., McGurk S. R. Schizophrenia. *Lancet*. 2004, 363(9426), 2063–2072.
- Nagai T., Yu J., Kitahara Y., Nabeshima T., Yamada K. D-Serine ameliorates neonatal PolyI:C treatment-induced emotional and cognitive impairments in adult mice. *J. Pharmacol. Sci.* 2012, 120, 213-227.
- Narayan S., Head S.R., Gilmartin T.J., Dean B., Thomas E.A. Evidence for disruption of sphingolipid metabolism in schizophrenia. *J Neurosci Res*. 2009, 87, 278–288.
- Nascimento J.M., Martins-de-Souza D. The proteome of schizophrenia. *Npj Schizophrenia*. 2015, 1, 14003.

- Nitoker N., Major D.T. Understanding the reaction mechanism and intermediate stabilization in mammalian serine racemase using multiscale quantum classical simulations. *Biochemistry*. 2014, *54*(2), 516–527.
- Niu J., Mei F., Li N., Wang H, Li X., Kong J, Xiao L. Haloperidol promotes proliferation but inhibits differentiation in rat oligodendrocyte progenitor cell cultures. *Biochemistry And Cell Biology*. 2010, *88*(4), 611-620.
- Nozaki T., Shigeta Y., Saito-Nakano Y., Imada M., Kruger W.D. "Characterization of transsulfuration and cysteine biosynthetic pathways in the protozoan hemoflagellate, *Trypanosoma cruzi*. Isolation and molecular characterization of cystathionine beta-synthase and serine acetyltransferase from *Trypanosoma*". *The Journal of Biological Chemistry*. 2001, *276*(9), 6516–23.
- Ohnuma T., Arai H. Significance of NMDA receptor-related glutamatergic amino acid levels in peripheral blood of patients with schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2011, *35*(1), 29–39.
- Ohnuma T., Sakai Y., Maeshima H., Hatano T., Hanzawa R., Abe S., Kida S., Shibata N., Suzuki T., Arai H. Changes in plasma glycine, L-serine, and D-serine levels in patients with schizophrenia as their clinical symptoms improve: results from the Juntendo University Schizophrenia Projects (JUSP). *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry*. 2008, *32*(8), 1905-1912.
- Owen J., Sawa A., Mortensen P.B. Schizophrenia. *The Lancet*. 2016, *388* (10039), 86 – 97.
- Owe-Larsson B., Ekdahl K., Edbom T., Ösby U., Karlsson H., Lundberg C., et al. Increased plasma levels of thioredoxin-1 in patients with first episode psychosis and long-term schizophrenia. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*. 2011, *35*(4), 1117–1121.
- Ozeki Y., Sekine M., Fujii K., et al. Phosphoserine phosphatase activity is elevated and correlates negatively with plasma D-serine concentration in patients with schizophrenia. *Psychiatry Res*. 2016, *237*, 344–350.
- Pal R., Barenholz Y., Wagner R.R. Effect of cholesterol concentration on organization of viral and vesicle membranes. Probed by accessibility to cholesterol oxidase. *J Biol Chem*. 1980, *255*, 5802–6.

- Panee J., Liu W., Nakamura K., Berry M.J. The responses of HT22 cells to the blockade of mitochondrial complexes and potential protective effect of selenium supplementation. *Int J Biol Sci.* 2007, 3(5), 335–41.
- Panizzutti R., Fisher M., Garrett C., Man W.H., Sena W., Madeira C., Vinogradov S. Association between increased serum d-serine and cognitive gains induced by intensive cognitive training in schizophrenia. *Schizophrenia Research.* 2018, ISSN 0920-9964.
- Paolicelli R.C., Bolasco G., Pagani F., et al. Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science.* 2011, 333, 1456–58.
- Paz R.D., Tardito S., Atzori M., Tseng K.Y. Glutamatergic dysfunction in schizophrenia: From basic neuroscience to clinical psychopharmacology. *European Neuropsychopharmacology.* 2008, 18, 773–786.
- Petronijevic N.D., Radonjic N.V., Ivkovic M.D., Marinkovic D., Piperski V.D., Duricic B.M., Paunovic V.R. Plasma homocysteine levels in young male patients in the exacerbation and remission phase of schizophrenia. *Prog. Neuro-psychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 2008, 32, 1921-1926.
- Peyrovian B., Rosenblat J.D., Pan Z., Iacobucci M., Brietzke E., McIntyre R.S. The glycine site of NMDA receptors: A target for cognitive enhancement in psychiatric disorders. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry.* 2019, 92, 387-404
- Pillai A., Parikh V., Terry A.V., Jr, Mahadik S.P. Long-term antipsychotic treatments and crossover studies in rats: differential effects of typical and atypical agents on the expression of antioxidant enzymes and membrane lipid peroxidation in rat brain. *J Psychiatr Res.* 2007, 41, 372–386.
- Polymeropoulos M. H., Licamele L., Volpi S., Mack K., Mitkus S. N., Carstea E. D., Getoor L., Thompson A, Lavedan C. Common effect of antipsychotics on the biosynthesis and regulation of fatty acids and cholesterol supports a key role of lipid homeostasis in schizophrenia. *Schizophrenia Research.* 2009, 108(1-3), 134–142.
- Pronk J.C., van Kollenburg B., Scheper G.C., van der Knaap M.S. Vanishing white matter disease: a review with focus on its genetics. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev.* 2006, 12, 123–128.

- Quraishi H., Brown I.R. Expression of heat shock protein 90 (hsp90) in neural and nonneural tissues of the control and hyperthermic rabbit. *Exp. Cell. Res.* 1995, *219*, 358-363.
- Rajasekaran A., Venkatasubramanian G., Berk M., Debnath M. Mitochondrial dysfunction in schizophrenia: pathways, mechanisms and implications. *Neurosci Biobehav Rev.* 2015, *48*, 10–21.
- Rajkumar A.P., Chitra C., Bhuvaneshwari S., Poonkuzhali B., Kuruvilla A., Jacob K.S. Clinical Predictors of Response to Clozapine in Patients with Treatment Resistant Schizophrenia. *Psychopharmacology Bulletin.* 2011, *44*(3), 51-65.
- Ramakers G.J. Rho proteins, mental retardation and the cellular basis of cognition. *Trends Neurosci.* 2002, *25*, 191–199.
- Rayman M.P. Selenium and human health. *Lancet.* 2012, *379*(9822), 1256–68.
- Roberts R.C. Postmortem studies on mitochondria in schizophrenia. *Schizophr. Res.* 2017, *187*, 17-25.
- Rotruck J.T., Pope A.L., Ganther H.E., Swanson A.B., Hafeman D.G., Hoekstra W.G. Selenium: Biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science.* 1973 *179*(4073), 588–90.
- Rubio M.D., Wood K., Haroutunian V., Meador - Woodruff J.H. Dysfunction of the ubiquitin proteasome and ubiquitin-like systems in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology.* 2013, *38*(10), 1910-20.
- Saneyoshi T., Fortin D.A., Soderling T.R. Regulation of spine and synapse formation by activity-dependent intracellular signaling pathways. *Curr Opin Neurobiol.* 2010, *20*, 108–115.
- Santos A.R., Mele M., Vaz S.H., Kellermayer B., Grimaldi M., Colino-Oliveira M., et al. Differential role of the proteasome in the early and late phases of BDNF-induced facilitation of LTP. *J Neurosci.* 2015, *35*, 3319–29.
- Sawa A., Seidman L.J. Is prophylactic psychiatry around the corner? Combating adolescent oxidative stress for adult psychosis and schizophrenia. *Neuron.* 2014, *83*, 991–93.
- Schafer D.P., Lehrman E.K., Kautzman A.G., et al. Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. *Neuron.* 2012, *74*, 691–705.

- Schell M.J. The N-methyl-d-aspartate receptor glycine site and d-serine metabolism: an evolutionary perspective. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2004, 359(1446), 943–964.
- Schell M.J., Molliver M.E., Snyder S.H. D-serine, an endogenous synaptic modulator: localization to astrocytes and glutamate-stimulated release. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995, 92(9), 3948–3952.
- Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium. Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci. *Nature.* 2014, 511, 421–27.
- Schmitt A., Wilczek K., Blennow K., Maras A., Jatzko A., Petroianu G., Braus D.F., Gattaz W.F. Altered thalamic membrane phospholipids in schizophrenia: a postmortem study. *Biol Psychiatry.* 2004, 56, 41–45.
- Schmitt A., Steyskal C., Bernstein H.G., Schneider-Axmann T., Parlapani E., Schaeffer E.L. *et al.* Stereologic investigation of the posterior part of the hippocampus in schizophrenia. *Acta Neuropathol.* 2009, 117, 395–407.
- Schmitt A., Malchow B., Hasan A., Falkai P. The impact of environmental factors in severe psychiatric disorders. *Frontiers in Neuroscience.* 2014, 8, 1–10.
- Schroeder F., Zhou M., Swaggerty C.L., Atshaves B.P., Petrescu A.D., Storey S., Martin G.G., Huang H., Helmkamp G.M., Ball J.M. Sterol carrier protein-2 functions in phosphatidylinositol transfer and signaling. *Biochemistry.* 2003, 42, 3189–3202.
- Schwarz E., Prabakaran S., Whitfield P., Major H., Leweke F.M., Koethe D., McKenna P., Bahn S. High throughput lipidomic profiling of schizophrenia and bipolar disorder brain tissue reveals alterations of free fatty acids, phosphatidylcholines, and ceramides. *J Proteome Res.* 2008, 7, 4266–4277.
- Scott E.K., Reuter J.E., Luo L. Small GTPase Cdc42 is required for multiple aspects of dendritic morphogenesis. *J Neurosci.* 2003, 23, 3118–3123.
- Scott M.R., Meador-Woodruff J.H. Intracellular compartment-specific proteasome dysfunction in postmortem cortex in schizophrenia subjects. *Molecular Psychiatry.* 2019, 1476-5578UR.
- Scott M.R., Rubio M.D., Haroutunian V., Meador-Woodruff J.H. Protein Expression of Proteasome Subunits in Elderly Patients with Schizophrenia. *Neuropsychopharmacology.* 2016, 41, 896–905.

- Sethi S., Hayashi M.A., Barbosa B.S., Pontes J.G., Tasic L., Brietzke E. Lipidomics, biomarkers, and schizophrenia: A current perspective. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2017, 965, 265-290.
- Sherman M.Y., Goldberg A.L. Cellular defenses against unfolded proteins: a cell biologist thinks about neurodegenerative diseases. *Neuron.* 2001, 29, 15-32.
- Shimazu T., Hirschey M.D., Hua L., Dittenhafer-Reed K.E., Schwer B., Lombard D.B., Li Y., Bunkenborg J., Alt F.W., Denu J.M., Jacobson M.P., Verdin E. SIRT3 deacetylates mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA synthase 2 and regulates ketone body production. *Cell Metab.* 2010, 12(6), 654-61.
- Sonogo M., Gajendra S., Parsons M., Ma Y., Hobbs C., Zentar M.P., Williams G., Machesky L.M., Doherty P., Lalli G. Fascin regulates the migration of subventricular zone-derived neuroblasts in the postnatal brain. *J Neurosci.* 2013, 33(30), 12171-85.
- Song X., Fan X., Li X., Kennedy D., Pang L., Quan M., Chen X., Gao J., Zhang W., Zhang J., Lv L. Serum levels of BDNF, folate and homocysteine: In relation to hippocampal volume and psychopathology in drug naïve, first episode schizophrenia. *Schizophrenia Research.* 2014, 159(1), 51-55.
- Srisurapanont M., Suttajit S., Maneeton N., Maneeton B. Efficacy and safety of aripiprazole augmentation of clozapine in schizophrenia: a systematic review and metaanalysis of randomized-controlled trials. *Journal of Psychiatric Research.* 2015, 62, 38–47.
- Steinbrenner H., Sies H. Protection against reactive oxygen species by selenoproteins. *Biochim Biophys Acta.* 2009, 1790(11), 1478–85.
- Stephens W. E. A pulsed mass spectrometer with time dispersion. *Phys. Rev.* 1946, 69, 691–691.
- Sulistio Y.A., Heese K. "The Ubiquitin-Proteasome System and Molecular Chaperone Deregulation in Alzheimer's Disease". *Molecular Neurobiology.* 2015, 53, 905–31.
- Taha A.Y., Cheon Y., Ma K., Rapoport S.I., Rao J.S. Altered fatty acid concentrations in prefrontal cortex of schizophrenic patients. *J Psychiatr Res.* 2013, 47(5), 636-43.
- Tandon R. Antipsychotics in the Treatment of Schizophrenia. *The Journal of Clinical Psychiatry.* 2011, 72, 4–8.

- Taneli F., Pirildar S., Akdeniz F., Uyanik B.S., Ari Z. Serum nitric oxide metabolite levels and the effect of antipsychotic therapy in schizophrenia. *Arch Med Res.* 2004, *35*, 401–405.
- Tsai G., Yang P., Chung L.C., Lange N., Coyle J.T. D-serine added to antipsychotics for the treatment of schizophrenia. *Biol. Psychiatry*, 1998, *44*, 1081-1089.
- Türmer K., Orbán J., Gróf P., Nyitrai M. Fascin and alpha-actinin can regulate the conformation of actin filaments. *Biochim Biophys Acta.* 2015, *1850*(9), 1855-1861.
- Uhlhaas PJ, Singer W. Abnormal neural oscillations and synchrony in schizophrenia. *Nat Rev Neurosci.* 2010, *11*, 100–13.
- Uranova N.A., Casanova M.F., DeVaughn N.M., Orlovskaya D.D., Denisov D.V. Ultrastructural alterations of synaptic contacts and astrocytes in postmortem caudate nucleus of schizophrenic patients. *Schizophr. Res.* 1996, *22*(1), 81–83.
- Uranova N.A., Orlovskaya D., Vikhрева O., Zimina I., Kolomeets N., Vostrikov V., Rachmanova V. Electron microscopy of oligodendroglia in severe mental illness. *Brain Res. Bull.* 2001, *55*, 597–610.
- Uranova N.A., Vostrikov V.M., Orlovskaya D.D., Rachmanova V.I. Oligodendroglial density in the prefrontal cortex in schizophrenia and mood disorders: a study from the Stanley Neuropathology Consortium. *Schizophr Res.* 2004, *67*, 269–275.
- Uranova N.A., Vostrikov V.M., Vikhрева O.V., Zimina I.S., Kolomeets N.S., Orlovskaya D.D. The role of oligodendrocyte pathology in schizophrenia. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 2007, *10*(4), 537–545.
- Vawter M.P, Barrett T., Cheadle C., Sokolov B.P., Wood W.H. 3rd, Donovan D.M., Webster M., Freed W.J., Becker K.G. Application of cDNA microarrays to examine gene expression differences in schizophrenia. *Brain Res Bull.* 2001, *55*, 641–650.
- Vermeer, S. E., van Dijk, E. J., Koudstaal, P. J., Oudkerk, M., Hofman, A., Clarke, R., & Breteler, M. M. B. (2002). Homocysteine, silent brain infarcts, and white matter lesions: The Rotterdam Scan Study. *Annals of Neurology*, *51*(3), 285–289.
- Verrall L., Walker M., Rawlings N., et al. D-Amino acid oxidase and serine racemase in human brain: normal distribution and altered expression in schizophrenia. *Eur J Neurosci.* 2007, *26*(6), 1657–1669.

- Vikhreva O.V., Rakhmanova V.I., Orlovskaya D.D., Uranova N.A. Ultrastructural alterations of oligodendrocytes in prefrontal white matter in schizophrenia: a postmortem morphometric study. *Schizophr. Res.* 2016, *S0920-9964(16)*, 30173–30176.
- Vostrikov V.M., Uranova N.A., Orlovskaya D.D. Deficit of perineuronal oligodendrocytes in the prefrontal cortex in schizophrenia and mood disorders. *Schizophr Res.* 2007, *94*, 273–280.
- Vuksan-Ćusa B., Jakovljević M., Šagud M., Peleš A.M., Marčinko D., Topić R., Mihaljević S., Sertić J. Metabolic syndrome and serum homocysteine in patients with bipolar disorder and schizophrenia treated with second generation antipsychotics. *Psychiatry Research.* 2011, *189(1)*, 21-25.
- Waddington J. L., Hennessy R. J., O'Tuathaigh C. M. P., Russell V.R. Schizophrenia and the lifetime trajectory of psychotic illness: developmental neuroscience and pathobiology, redux. In: Brown A. S., Patterson P. H., editors. *The Origins of Schizophrenia*. New York, NY, USA: Columbia University Press; 2012, p. 3–21.
- Wakade C.G., Mahadik S.P., Waller J.L., Chiu F.-C. Atypical neuroleptics stimulate neurogenesis in adult rat brain. *J Neurosci Res.* 2002, *69*, 72–79.
- Walker E., Kestler L., Bollini A., Hochman, K. M. Schizophrenia: etiology and course. *Annual Review of Psychology.* 2004, *55*, 401–430.
- Wang D., Cheng S.L., Fei Q., Gu H., Raftery D., Cao B., Sun X., Yan J., Zhang C., Wang J. Metabolic profiling identifies phospholipids as potential serum biomarkers for schizophrenia. *Psychiatry Research.* 2019, *272*, 18-29.
- Wang H.D., Dunnavant F.D., Jarman T., Deutch A.Y. Effects of antipsychotic drugs on neurogenesis in the forebrain of the adult rat. *Neuropsychopharmacology.* 2004, *29*, 1230–1238.
- Weber-Fahr W., Englisch S., Esser A., Tunc-Skarka N., Meyer-Lindenberg A., Ende G., Zink M. Altered phospholipid metabolism in schizophrenia: a phosphorus 31 nuclear magnetic resonance spectroscopy study. *Psychiatry Res Neuroimaging.* 2013, *214*, 365–373.
- Whitehouse C.M., Dreyer R.N., Yamashita M., Fenn J.B. Electrospray interface for liquid chromatographs and mass spectrometers. *Anal. Chem.* 1985, *57*, 675.

- Wiley W. C. and McLaren I. H. Time-of-Flight Mass Spectrometer with Improved Resolution. *Review of Scientific Instruments*. 1955, 26(12), 1150-1157.
- Wolosker H., Sheth K.N., Takahashi M., Mothet J.P., Brady R.O., Ferris C.D., Snyder S.H. Purification of serine racemase: biosynthesis of the neuromodulator D-serine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1999, 96,721-725.
- Wolosker H., Balu D.T., Coyle J.T. The Rise and Fall of the D-Serine-Mediated Gliotransmission Hypothesis. *Trends Neurosci.* 2016, 39(11), 712-721.
- Wu J.Q., Kosten T.R., Zhang X.Y. Free radicals, antioxidant defense systems, and schizophrenia. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2013, 46, 200–206.
- Wysokinski A., Kloszewska I. Homocysteine levels in patients with schizophrenia on clozapine monotherapy. *Neurochem. Res.* 2013, 38, 2056-2062.
- Xu H., Zhang H., Zhang J., Huang Q., Shen Z., Wu R. Evaluation of Neuron-glia Integrity by in vivo Proton Magnetic Resonance Spectroscopy: Implications for Psychiatric Disorders. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2016, 71, 563-577.
- Yamada K., Ohnishi T., Hashimoto K., et al. Identification of multiple serine racemase (SRR) mRNA isoforms and genetic analyses of SRR and DAO in schizophrenia and D-serine levels. *Biol Psychiatry*. 2005, 57(12), 1493–1503.
- Yan Z., Kim E., Datta D., Lewis D.A., Soderling S.H. Synaptic Actin Dysregulation, a Convergent Mechanism of Mental Disorders? *J Neurosci*. 2016, 36(45), 11411-11417.
- Yang J., Chen T., Sun L., Zhao Z., Qi X., Zhou K., Cao Y., Wang X., Qiu Y., Su M., Zhao A., Wang P., Yang P., Wu J., Feng G., He L., Jia W., Wan C. Potential metabolite markers of schizophrenia. *Mol Psychiatry*. 2013, 18(1), 67-78.
- Yao J.K., Keshavan M.S. Antioxidants, redox signaling, and pathophysiology in schizophrenia: an integrative view. *Antioxid. Redox Signal*. 2011, 15(7), 2011–2035.
- Yassa R., Jeste D.V. Gender differences in tardive dyskinesia: a critical review of the literature. *Schizophr Bull*. 1992, 18, 701-715.
- Yazici E., Tugba M.P., Guzel D., Yazici A.B., Akcay Ciner O., Erol A. Klotho, vitamin D and homocysteine levels during acute episode and remission periods in schizophrenia patients. *Nordic Journal of Psychiatry*. 2019, 73(3), 178-184.

- Yilmaz N., Herken H., Cicek H.K., Celik A., Yureklin M., Akyol O. Increased levels of nitric oxide, cortisol and adrenomedullin in patients with chronic schizophrenia. *Med Princ Pract.* 2007, 6, 137–141.
- Youle R.J., van der Blik A.M. Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science.* 2012, 337, 1062–1065.
- Zhang X.Y., Xiu M.H., Wang F., Qi L.Y., Sun H.Q., Chen S., et al. The novel oxidative stress marker thioredoxin is increased in first-episode schizophrenic patients. *Schizophr. Res.* 2009, 113(2), 151–157.
- Zhang Y., Zhang H., Wang L., Jiang W., Xu H., Xiao L., Li X. M. Quetiapine enhances oligodendrocyte regeneration and myelin repair after cuprizone-induced demyelination. *Schizophrenia Research.* 2012, 138(1), 8–17.
- Zhao Z., Xu J., Chen J., Kim S., Reimers M., Bacanu S.A., Yu H., Liu C., Sun J., Wang Q., Jia P., Xu F., Zhang Y., Kendler K.S., Peng Z., Chen X. Transcriptome sequencing and genome-wide association analyses reveal lysosomal function and actin cytoskeleton remodeling in schizophrenia and bipolar disorder. *Mol Psychiatry.* 2015, 20(5), 563-572.

10. ANEXOS

10.1 Artigo de Revisão

Seabra G., Falvella A.C.B., Guest P.C., Martins-de-Souza D., de Almeida V. Proteomics and Lipidomics in the Elucidation of Endocannabinoid Signaling in Healthy and Schizophrenia Brains. *Proteomics*. 2018, 18(18), e1700270.

Proteomics and lipidomics in the elucidation of endocannabinoid signaling in healthy and schizophrenia brains

Gabriela Seabra¹, Ana Caroline B. Falvella¹, Paul C. Guest¹,
Daniel Martins-de-Souza^{1,2}, Valéria de Almeida^{1*}

- 1- Laboratory of Neuroproteomics, Department of Biochemistry and Tissue Biology, Institute of Biology, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, Brazil
- 2- Instituto Nacional de Biomarcadores em Neuropsiquiatria (INBION) Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil

* Correspondence:

Valeria Almeida, PhD

Department of Biochemistry and Tissue Biology

University of Campinas (UNICAMP)

Rua Monteiro Lobato 255

13083-862, Campinas/Sao Paulo/Brazil

Telephone: +55 (19) 35216132

E-mail: val_farmac@yahoo.com.br

Abbreviations:

2-AG - 2-arachidonoylglycerol; **AA** - arachidonic acid; **ABHD6** - α , β -hydrolase domain containing protein 6; **ABHD12** - α , β -hydrolase domain containing protein 12; **ABHD4** - α , β -hydrolase domain containing protein 4; **ABPP** - activity-based protein profiling; **ACC** - anterior cingulate cortex; **AEA** - anandamide; **BPRS** - brief psychiatric rating

scale; **CB1** - cannabinoid receptor type 1; **CB2** - cannabinoid receptor type 2; **CBD** - cannabidiol; **CBDA** - cannabidiol acid; **CBDV** - cannabidivarin; **CBDVA** - cannabidivarin acid; **CBG** - cannabigerol; **COX2** - cyclooxygenase-2; **CNR1** - cannabinoid receptor 1; **CNR2** - cannabinoid receptor 2; **DAGL α** - diacylglycerol lipase alpha; **DAGL β** - diacylglycerol lipase beta; **DHEA** - docosahexaenoylethanolamine; **DISC1** - disrupted in schizophrenia 1; **DLPFC** - dorsolateral prefrontal cortex; **DMS** - differential mobility spectrometry; **FAAH** - fatty acid amide hydrolase; **FAIMS** - field-asymmetric waveform ion mobility spectrometry; **FDA** - food and drug administration; **GPR55** - G-protein coupled receptor 55; **LEA** - dihomo- γ -linolenoylethanolamine; **MAGL** - monoacylglycerol lipase; **mRNA** - messenger ribonucleic acid; **MS** - multiple sclerosis; **NAAA** - N-acylethanolamine-hydrolyzing acid amidase; **NAEs**-N-acylethanolamines; **NAPE** - N-acyl-phosphatidylethanolamine-phospholipase; **NAPEPLD**-N-acyl-phosphatidylethanolamine-hydrolyzing phospholipase D; **Nrg1** **HET** - neuregulin 1 transmembrane heterozygous; **OEA** - oleoylethanolamine; **PANSS** - positive and negative syndrome scale; **PARK7** - parkinsonism associated deglycase; **PBMCs** - human peripheral blood mononuclear cells; **PCP** - phencyclidine; **PD** - Parkinson's disease; **PEA** - palmitylethanolamide; **PET** - positron emission tomography; **PPARs** - peroxisome proliferator-activated nuclear receptors; **Δ 9-THC** - Δ 9-tetrahydrocannabinol; **THCV** - Δ 9-tetrahydrocannabivarin; **THCVA** - Δ 9-tetrahydrocannabivarin acid; **TRPV1** - transient receptor potential vanilloid-1 channel; **STRING** - search tool for recurring instances of neighboring genes; **WT** - wild-type.

Key words: 2-arachidonoylglycerol, anandamide, cannabinoids, *Cannabis sativa*, mass spectrometry

Total number of words: 11716

Abstract

Interest in the modulation of endocannabinoid signaling has increased since the discovery of receptors for compounds of *Cannabis sativa*. Endocannabinoids are crucial neuromodulators of many brain functions and changes in the ligands and their receptors have been associated with psychiatric disorders, such as schizophrenia. Genetic, neuroimaging, and behavioral studies have reinforced the role of

endocannabinoids in the pathobiology of schizophrenia. However, molecular pathways and biological processes involved in cannabinoid effects are not totally understood. Additionally, the endocannabinoid signaling network with other non-cannabinoid targets, and the effects of phytocannabinoids increase the complexity to understand their role in schizophrenia and homeostasis conditions. Thus, proteomic studies can provide evidence about the involvement of cannabinoid receptors, as well as the metabolic and synthetic enzymes of the endocannabinoids in these disorders. Additionally, quantification of endocannabinoids in the blood serum or cerebrospinal fluid can be a useful approach to identify new biomarkers in schizophrenia, and lipidomic techniques can be used to quantify these compounds. Herein, we review proteomic and lipidomic studies which have been used for analysis of the endocannabinoid system in healthy and schizophrenia function. The findings may contribute to understand the involvement of endocannabinoids in the brain and in the neurobiological basis of schizophrenia.

The endocannabinoid system

Cannabis sativa has been used as a recreational drug since ancient times. This plant contains more than 70 phytocannabinoids, which can present several pharmacological uses in disorders of central and peripheral nervous systems [1]. In the late 1980s and early 1990s, the cannabinoid receptors [2] and their endogenous ligands [3] were discovered. Since this time, increasing interest in modulation of the endocannabinoid system has been observed. The endocannabinoid system consists of multiple molecules (Table 1, Figure 1 and Figure 2). The most studied of these are the endocannabinoids anandamide and 2-arachidonoylglycerol (2-AG), the degradative enzymes fatty acid amide hidrolase (FAAH) and monoacylglycerol lipase (MAGL), the biosynthetic enzymes N-acyl-phosphatidylethanolamine-phospholipase (NAPE), diacylglycerol lipase alpha (DAGL α) and beta (DAGL β), as well the type 1 (CB1) and 2 (CB2) cannabinoid receptors [3-5].

Endocannabinoid signaling operates according to a different mechanism compared to that seen in classical neurotransmission. The classic neurotransmitters are stored at synaptic vesicles at presynaptic neurons, and once released in the synaptic cleft, act on specific receptors in postsynaptic neurons. Differently,

endocannabinoids are synthesized upon demand at postsynaptic neurons (Figure 2) and, due to their lipophilic properties, they are not stored in vesicles, as classical neurotransmitters. Once released by the postsynaptic neurons, these signaling molecules act as retrograde messengers, by binding to cannabinoid receptors at presynaptic. After this, endocannabinoids are removed rapidly from synapses by transporters at neuronal membranes. In neurons, anandamide is hydrolyzed by FAAH or N-acyl-ethanolamine-hydrolyzing acid amidase (NAAA), producing ethanolamine and arachidonic acid [6-8]. The MAGL has the greatest responsibility for degradation of 2-AG to glycerol and arachidonic acid [9], although the serine hydrolases α , β -hydrolase domain containing protein 6 and 12 (ABHD6 and ABHD12) also mediate 2-AG degradation [10] (Figure 2).

Although the definition of endocannabinoid system as their receptors, ligands, and enzymes is widely known, this signaling presents a high complexity [11]. For instance, anandamide and 2-AG can binding to other non-CB1/BC2 receptors such as G-protein coupled receptor 55 (GPR55), peroxisome proliferator-activated nuclear receptors (PPARs), and transient receptor potential vanilloid-1 (TRPV1) channel [12-15]. Moreover, the enzymes involved in biosynthetic pathways and enzymatic hydrolysis of anandamide and 2-AG can also participate in metabolic process of other N-acyl-ethanolamines and 2-mono-acyl-glycerols. Likewise, anandamide and 2-AG can be metabolized by other non-cannabinoid enzymes, such as cyclooxygenase-2 (COX2) - an important component of inflammatory pathways [16].

This complexity of endocannabinoid signaling can be extended to phytocannabinoids. As mentioned, *Cannabis* plant presents more than 70 compounds, among these the Δ 9-tetrahydrocannabinol (Δ 9-THC) seems to be the most important psychotomimetic phytocannabinoid. The main targets of Δ 9-THC are the CB1 and CB2 receptors. Other phytocannabinoids, such as cannabidiol (CBD), CBD acid (CBDA), cannabidivarin (CBDV), cannabigerol (CBG), Δ 9-tetrahydrocannabivarin (THCV), THCV acid (THCVA), and CBDV acid (CBDVA) can directly act on cannabinoid receptors, or can produce effect through modulation of enzymatic process [11].

Take this complexity into account, the investigation of endocannabinoid system, as well as the effects of phytocannabinoids or synthetic cannabinoids by several methodologies could increase the knowledge about the regulation of endocannabinoid signaling as a whole. Considering the large number of proteins and intricate protein networks involved in these functions, the implementation of proteomic and lipidomic

profiling studies may help to elucidate endocannabinoid activity in basal and pathological psychiatric conditions.

Proteomics and lipidomics in the investigation of endocannabinoid system

Mass spectrometry-based proteomic and lipidomic techniques are potential tools to understand the molecular mechanism involved in brain disorders. Proteomics and lipidomics can simultaneously quantify a large number of proteins and lipids in samples, under different conditions (for instance, drug treatment, substance abuse, and basal or pathological state). Associated with the proteome and lipidome data, *in silico* systems biology-based analysis can unravel pathways and biological process implicated in the pathobiology of diseases and physiology function, under certain condition that could not be investigated by other technical tools. Therefore, the association of these tools is crucial to better understand the role of the endocannabinoid signaling in the brain homeostasis and schizophrenia pathophysiology.

Schizophrenia and endocannabinoid system

The first evidence of endocannabinoid system in schizophrenia was provide from the observation about high *Cannabis* abuse among patients [17, 18]. Consistent findings have shown that cannabis abuse worsens the symptoms of schizophrenia patients [19, 20], and increases the risk for schizophrenia development in vulnerable individuals [21]. Δ 9-THC seems to be the main responsible for these effects. On the other hand, another phytocannabinoid - CBD - presents antipsychotic properties in patients [8, 22, 23].

Studies have investigated the genetic relationship between schizophrenia and endocannabinoid system. The main findings point to CNR1 polymorphisms in this disorder [24-27], while these polymorphisms were not confirmed by other studies [28, 29]. Ho et al. (2011) found that the interaction of *CNR1* genetic polymorphisms (such as rs12720071) with heavy cannabis use in schizophrenia patients resulted in decreased white matter brain volume, and cognitive impairment. This corroborates

with the hypothesis that schizophrenia is mediated by genetic and environmental factors [30]. In addition, Ishiguro et al. (2010) found that variations in rs2501432 (R63Q) and rs12744386 polymorphisms in the CNR2 gene might have a role in the pathophysiology of schizophrenia [31].

Neuroimaging studies, using Positron Emission Tomography (PET), have been used to investigate CB1 in schizophrenia [32] (Table 2). Studies using different radioligands have shown increase of the CB1 binding in some brain areas associated with the pathophysiology of this disorder [33-35]. A postmortem study corroborated this finding [36]. In contrast, another PET investigation reported a decrease in CB1 binding in schizophrenia patients compared to controls [37]. These divergent findings might be related to the gender, sex and age of the subjects, the different affinity and pharmacokinetics of PET tracers, the disease duration, and the substance abuse [32, 38]. In this context, future PET studies on CB1 in schizophrenia should be designed with a complex data set obtained in a large-scale investigation [32]. However, the PET studies are not able to elucidate pathways or biological processes in regulation of CB1 in several conditions, for instance, in *Cannabis* abuse or antipsychotic treatment conditions. Thus proteomic-related techniques could be interesting in this field.

Postmortem investigations based on radioligand binding have demonstrated alterations in CB1. Some studies measured CB1 autoradiographic density in schizophrenia, and found higher levels of this receptor in the dorsolateral prefrontal cortex (DLPFC) [39, 40], and in the cingulate cortex [41, 42]. On the other hand, studies using immunodetection methods detected a decreased CB1 protein expression in the DLPFC [43-45], and no changes in CB1 levels in the cingulate cortex in schizophrenia [46].

Moreover, increased CB1 and CB2 receptors in peripheral blood leukocytes were detected by flow cytometry in schizophrenia patients compared to controls [47]. Another group found increased levels of CB1 and CB2 mRNA in the human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from patients with schizophrenia [48]. In addition, Ferretjans et al (2014) showed that increased cannabinoid receptors expression on lymphocytes and monocytes was significantly correlated with worst outcomes in cognitive performance [49]. Together, these findings point to dysregulation of endocannabinoid signaling also in the peripheral system, and possible implications for immune responses in schizophrenia.

Animal models have also contributed to understand the pathophysiology of schizophrenia. A PET study reported increased CB1 expression in the adulthood progeny of female rats exposed to poly I:C during gestational period [50]. Another group found changes in CB1 expression in the DISC1 mutant mice [51]. The increase in CB1 was also observed in offspring from maternal malnutrition via high-fat or low-protein diets, a model of maternal disturbance [52]. Moreover, increased mRNA levels of NAPE-PLD, MAGL, CB1, DAGL β and DAGL α were detected in brains of socially isolated rats, especially in cortical layers, and prefrontal and thalamic regions [53]. The authors also verified a decreased FAAH mRNA expression in the caudate putamen, some prefrontal regions, and cortical layers of those animals [53]. In contrast, studies using a pharmacological model of schizophrenia, the PCP-treated rats, did not find change in CB1 expression [54-56].

Although genetic, neuroimaging, and behavioral studies have reinforced the role of cannabinoids in the pathobiology of schizophrenia, molecular pathways and biological processes involved in cannabinoid effects are not totally understood. Moreover, the multifactorial profile of the schizophrenia etiology results in a high complexity of protein expression and molecular pathways that can be investigated using proteomic-related methods. Finally, the diagnosis and treatment of schizophrenia is only based in clinical findings. In this regard, the investigation of endocannabinoids as biomarkers for disease prognosis or treatment response could be an interest approach to assist psychiatrist.

Proteomic contribution to unravel the endocannabinoid signaling

The main proteins involved in endocannabinoid signaling can be found in several tissues, where they are involved in several biological processes (Table 1). Between these proteins, those related to enzymatic biosynthesis and metabolic play a key role in the endocannabinoid signaling pathways. Initially, it was accepted that FAAH and MAGL were the main responsible for anandamide and 2-AG hydrolyses. Although, at least for 2-AG, proteomic studies have shown the role of others enzymes in this process.

A proteomic tool used to investigate endocannabinoid enzymes is the activity-based protein profiling (ABPP) [57]. This technique actively target proteins of interest,

enabling the identification and visualization of active enzymes [57, 58]. The ABPP probes can enrich, detect and identify various members of a protein class, which presents conserved functional features, clarifying alterations in protein activity that are not shown in protein abundance or transcript [59]. In this regard, a study using ABPP fluorophosphonate-biotin with avidin chromatography and advanced LC-MS analysis confirmed that MAGL is the main enzyme responsible for metabolism of 2-AG in brain, although there some conversion occurs via ABHD6 and ABHD12 - two previous uncharacterized enzymes in the hydrolyses of 2-AG [60].

A recent study used the ABPP approach, coupled with high-resolution MS analysis, to quantify the activity of serine hydrolases (DAGL- α , FAAH, ABHD6, ABHD12, MAGL, and ABDH4) associated with endocannabinoid biosynthesis and degradation in the hippocampus, cerebellum, frontal cortex and striatum [58]. Interestingly, the activity profiles of some enzymes were not found to be correlated to protein abundance, as reported in a global proteomics data set [61]. This suggests that the activity of these proteins could be regulated by other feed-forward or feed-back mechanism via alterations in post-translational modification, such as phosphorylation. For instance, ABHD12 abundance in the hippocampus was two-fold higher compared to that in other brain regions, but the activity of this enzyme was found to be the same [58]. MAGL activity was lowest in the cerebellum, while the activity of DAGL- α in that region was higher compared to the other regions, and FAAH was found to have the highest activity in the hippocampus and frontal cortex [58]. Together, these findings point to the variability in the expression of endocannabinoid enzymes across different brain regions [1, 61-63].

In this regard, these findings could be applied to understand the pathophysiology of schizophrenia. As mentioned, alterations in the endocannabinoid signaling have been reported in this disorder, but no data pinpoint the expression of endocannabinoid enzymes in schizophrenia. Thus, ABPP coupled with MS analysis can be a potential approach in this field.

Additionally, Viader et al. (2016) applied the ABPP technique combined with shotgun LC-MS to investigate the serine hydrolase activities in astrocytes, neurons, and microglia of mouse brain [64]. In this study, the brain cell proteomes were treated with a biotin-coupled fluorophosphonate (FP) probe, enriched with avidin chromatography and analyzed by Multidimensional Protein Identification Technology (MudPIT) - a chromatography-based proteomics approach that allows the large-scale

shotgun analyses of complex peptide mixtures - that present the two-dimensional chromatographic separation coupled to tandem MS. To note, the MudPIT approach represent a potential methodology for proteomic studies because its robustness and reproducibility [65]. In this way, Viader and colleagues [64] reported that the activity of several enzymes presented a good correlation with RNA-seq data, however some enzymes were not correlated, or even anti-correlated with this data [66]. Despite these differences, the ABPP/MudPIT analysis was able to detect the differential expression in the endocannabinoid enzymes between glial cells and neurons [64], consistent with the hypothesis that there is a cooperativity between these cells in the central nervous system [67]. In addition, Viader et al. (2016) found that serine hydrolases responsible for 2-AG metabolic process are mostly compartmentalized enzymes. The MAGL or DAGL α expression may be common in neurons, compared to microglia or astrocytes. On the other hand, ABHD12 and DAGL β were found to be highly expressed in microglia, and DAGL α is mostly found in astrocytes, while neurons or microglia express higher levels of DAGL β [64].

As mentioned above, 2-AG modulates several functions such as behavioral, mood, pain and neuroinflammation [68, 69], mainly through the effects of 2-AG on tripartite synapses and inter-neuronal communications [70-73]. Thus, proteomic studies may be applied to elucidate the mechanisms involved in the regulation of 2-AG levels, as well as a mean of pointing to potential novel therapeutic targets for brain disorders [64], especially those characterized by neuroinflammation.

In vivo study combining a selective pharmacological inhibition of DAGL, with chemical proteomic/lipidomic analysis enabled the observation of rapid and extensive changes in brain lipid signaling [74]. The inhibition of enzymes by chemical compounds is a useful approach to investigate the effects of acute blocked of enzymes, and its consequences in the signaling of physiological and pathological conditions. Although, the known complexity of endocannabinoid metabolic process can hamper the investigation of therapeutic potential of enzyme inhibitors, since anandamide and 2-AG share the enzymatic pathways with other lipids. In this regard, the association of pharmacological inhibition with proteomic and lipidomic techniques can provide a comprehensive overview about lipid network in brain [74]. Interestingly, this study found that the known DAGL α and DAGL β inhibitors affected not only 2-AG content, but also anandamide, prostaglandins, arachidonic acid, and diacylglycerols levels probably through cross-talk mechanism between endocannabinoid signaling [74].

The ABPP proteomic method also investigated the enzyme responsible for anandamide degradation (FAAH). Increasing interest in FAAH inhibitors has been shown in clinic for several disorders [75], for instance the BIA 10-2474, an irreversible inhibitor of FAAH, has been tested in humans, with disappointed results. One volunteer died and four others were hospitalized [76-79], with mild-to-severe neurological symptoms [78]. Therefore, van Esbroeck et al. (2017) used ABPP and mass spectrometry to determine the serine hydrolase interaction landscape of BIA 10-2474, in human cells and tissues [80]. Moreover, the authors compared its selectivity with PF04457845, a highly selective FAAH inhibitor that advanced to phase 2 trials without severe adverse events [81-83]. The authors showed that, at the lowest concentration tested (0.2 mM), both drugs had good selectivity for FAAH. However, across the drug concentration range, PF04457845 maintained its selectivity, while BIA 10-2474 (and its metabolite BIA 10-2639) showed various off-targets, including xenobiotic drug-metabolizing enzymes, and lipid hydrolases (such as ABHD6 and ABHD11) [80]. Most of these off-targets are substantial expressed in human brain tissue, being that many of them are involved in cellular lipid metabolism [84, 85]. Therefore, the use of FAAH inhibitors must be carefully study, since promiscuous compounds may alter cellular lipid networks in human cortical neurons, and deregulates the lipid metabolism in the CNS, contributing to neurotoxicity [80]. In this context, proteomic tools, such as ABPP and mass spectrometry may play a role in selectivity and toxicity studies of these compounds in humans and animal models.

Although the aforementioned studies did not use schizophrenia models or patients, they reveal interesting approaches to investigate the endocannabinoid signaling in this disorder.

Effects of cannabinoids on proteome: implications for schizophrenia

It has been shown that psychotomimetic effects of Δ 9-THC occurs by CB1 activation in neurons. However, effects of Δ 9-THC on proteome of brain cells are not totally understood. Similarly, the effects of CBD and others phytocannabinoids or synthetic cannabinoids on proteome are not investigated in schizophrenia pathobiology and treatment. Although, some studies have used proteome-related tools to investigate the effects of Δ 9-THC and CBD.

Proteomic studies can elucidate molecular fingerprints of CB1 activation by $\Delta 9$ -THC or other agonists in synaptic development and axonal growth. This could lead to an increased understanding of the molecular basis of cannabis-induced psychiatric illnesses [86]. Along these lines, matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) is an ionization technique [87] in which the sample is vaporized and ionized using an UV-absorbing chemical compound and a laser, producing multiply charged analytes [88]; and electrospray (ESI) [89], was innovative since it made possible the analysis of non-volatile, relatively large biomolecules, such as peptides and proteins [88]. In this way, these techniques (nLC-MALDI/MS/MS and nLC-ESI/MS/MS) showed the effects of THC on the neuronal proteome during neurodevelopment [90], suggesting that fetal cannabis exposure may have a negative impact on establishment of synaptic connectivity in neuronal networks underpinning memory, cognition and executive skills, leading to “circuit failure” in these systems. This might account for the observed increase in incidence of certain psychiatric disorders and drug addiction in the adult offspring of those individuals who had been exposed prenatally to *Cannabis* use.

Although some studies applying genetic, image, and behavioral task methodologies, as describe above (see Schizophrenia and endocannabinoid system section) have pinpointed a role of this system in the pathophysiology of schizophrenia [91, 92], few proteomic investigations have been carried out with the same goals in mind. In the case of preclinical studies, hippocampal samples from the neuregulin 1 transmembrane heterozygous (Nrg1 HET) mouse - a model of schizophrenia - was used in a proteome profiling analysis [93]. These animals and their wild-type (WT) littermates were treated with $\Delta 9$ -THC, and the proteome analyses demonstrated that Nrg1 HET mice presented changes in the abundance of proteins involved in several biological process (Table 3).

Another study investigated the effect of $\Delta 9$ -THC on the hippocampal proteome of adolescent and adult Wistar rats to elucidate the role of $\Delta 9$ -THC treatment on biological processes in brain [94]. This analysis found that the levels of 27 proteins involved in important biological processes were induced by $\Delta 9$ -THC treatment of adolescent animals. At the same time, 10 hippocampal proteins involved mainly in signaling pathways were more affected in adult rats following the same treatment. Taken together with the behavioral alterations, these proteomic findings suggest that the adolescent brain is more vulnerable to $\Delta 9$ -THC exposure, in comparison to adult brains.

In order to extend our knowledge of the pivotal protein constituents involved in the endocannabinoid system and psychiatric disorders, we used the *in silico* systems biology tool STRING (Search Tool for Recurring Instances of Neighboring Genes – Reference: doi: 10.1093/nar/gkw937). In this analysis, STRING was used to combine proteins of the endocannabinoid system (Table 1) with those modulated by Δ 9-THC in Wistar, wild type and the Nrg1 HET animals (Table 3). This highlighted the proteins NAPE-PLD and Parkinsonism associated deglycase (PARK7) as key hub proteins (Figure 3). NAPE-PLD is involved in the biosynthesis of several N-acylethanolamines (NAEs) in the mammalian brain [95], including anandamide. NAPE-PLD also plays a role in inflammatory processes [96]. The levels of this enzyme increase throughout brain development, suggesting that anandamide synthesis via the NAPE-PLD pathway can be higher at maturity, compared to earlier stages of life [97].

Moreover, NAPE-PLD-knockout mice show lower levels of anandamide and other NAEs, such as prostaglandins [63]. Thus, dysregulation of NAPE-PLD may affect the brain through inflammatory processes [98]. This is consistent with the idea that neuroinflammatory processes are implicated in the pathophysiology of schizophrenia and other psychiatric conditions. Additionally, NAPE-PLD is up-regulated in adolescent Nrg1 HET mice treated with Δ 9-THC, compared to a vehicle-treated group [93], suggesting a possible mechanism of Δ 9-THC in regulation of anandamide levels. Initially it was believed that phytocannabinoids like Δ 9-THC only has CB1/CB2 agonist properties, but currently studies have shown the effects of these compounds in enzymatic process, and with the analyses we reported a role of Δ 9-THC in NAPE-PLD (Figure 3). These findings warrant further investigation to increase our understanding of the potential role of NAPE-PLD in schizophrenia, and to explore this pathway for potential novel biomarkers and drug targets.

Another protein highlighted by our analyses was PARK7, which is involved in transcriptional regulation, protein degradation [99], neurotransmitter homeostasis [100-102] cell survival and proliferation [103, 104], and mitochondrial function regulation [105]. Moreover, PARK7 presents antioxidant and chaperone activity, and dysfunctions of this protein have been associated with neurodegenerative disorders, such as Parkinson disease [99]. In mammalian cells, oxidative stress induces changes in PARK7 properties [106, 107]. In this context, a study reported the involvement of PARK7 in protection against oxidative stress, particularly in neurons [108]. Moreover, Meiser et al. (2016) demonstrated that loss of PARK7 decreases serine biosynthesis

and glutamine influx, two pathways that provide precursors for *de novo* synthesis of glutathione, an important antioxidant [109].

In this regard, PARK7 levels were decreased in the hippocampus of adolescent Wistar rats treated with Δ 9-THC [94]. Thus, Δ 9-THC may increase the risk of oxidative stress, particularly in neurons. Moreover, the down-regulation of PARK7 induced by Δ 9-THC treatment may also impair neurotransmission [110], thereby altering the expression of neurotransmitter receptors through feed-forward and feedback mechanisms [111]. However, the function of PARK7 in schizophrenia has not been completely elucidated. A *postmortem* study did not find changes in PARK7 mRNA levels in brain of schizophrenia patients compared to controls [112]. To note, the main effects on PARK7 aforementioned is associated with Δ 9-THC that is not present in the *postmortem* study, since these patients were not *Cannabis* users. Thus, more efforts to understand the role of PARK7 in *Cannabis* abuse of schizophrenia patients are needed.

Another phytocannabinoid, CBD, has been implicated in schizophrenia. Unlike Δ 9-THC, CBD presents antipsychotic properties in schizophrenia patients [8, 22, 23] and in several animal models to study schizophrenia [113-118]. Although proteomic data about CBD in schizophrenia are limited. Some studies have shown the effects of CBD on behavioral-like schizophrenia symptoms associated with changes in protein levels by western blot, immunohistochemistry, and autoradiography receptor binding [97, 119, 120] (see Table 4). These studies point to important pathways in schizophrenia pathophysiology; however, proteomic investigations could substantially increase the understanding of protein, pathways, and mechanisms involved in antipsychotic properties of CBD.

Taken together, the proteomic findings may contribute to the understanding of the increased psychosis related to cannabis use in schizophrenia, and elucidate possible relations with genetic vulnerability in patients with this disease. Furthermore, this could lead to the identification of new biomarker candidates for monitoring disease risk, progression or treatment response.

Lipidomic studies

Lipids are comprised of compounds with long chain hydrocarbons, and they are involved in several biological processes in all tissues such as the brain, including exocytosis, ion channel regulation, membrane domain formation, localization and function of proteins in membranes, and cell signaling pathways [121]. Studies have shown that alterations in the brain lipid content may play a role in psychiatric disorders [122, 123]. Thus, investigations of the lipid levels in some of these disorders may help to elucidate their role in the pathophysiology. The most characterized endocannabinoids, anandamide and 2-AG, belong to the N-acylethanolamine and monoacylglycerol lipid classes, respectively. Therefore, the study of these endocannabinoids in healthy and pathological conditions can be achieved via lipidomic profiling techniques.

Lipidomics is the global study of lipids found in cells, tissues or organisms, and the changes of its levels under different physiological conditions. Lipidomic profiling can reveal the molecular pathways involved in the biotransformation of lipids [124], and provide data about the role of specific lipids in physiological and pathological signaling events in different tissues, such as the brain [123]. To quantify molecular species of lipids, LC or GC, combined with and ESI/MS, can be applied under atmospheric pressure conditions [121]. These platforms have allowed the acquisition of better lipid profiles, and are essential to explore the dynamics of individual and combined lipids in a signaling pathway [122]. However, these techniques are limited by chromatographic resolution for lipid separations. Additionally, the technologies required for quantification of the lipid-based endocannabinoids still requires some optimization [125], since anandamide and 2-AG are mostly present at low concentrations (pmol/g to nmol/g) in biological samples. As mentioned in the first section, endocannabinoids are produced upon demand and are not stored in vesicles or compartments, hampering their measurements in biological samples [126]. Moreover, the quantification of 2-AG seems to be more complex, due to its isomerization into 1-arachidonoyl glycerol (1AG) [125, 127]. These studies suggested that LC-MS/MS methods may be limited by interference from isobaric isomers, resulting in false results about 2-AG content.

Isobaric (molecules with the same nominal mass, but differently exact mass) and isomeric (molecules with the same molecular formula, but with different chemical

structure) species confer an overlap in between lipid classes, resulting in a poorly quantitative lipidomic profile in ESI/MS and LC-MS methods [128]. The isobaric/isomeric species are usually observed in lipids. In this regard, the differential mobility spectrometry (DMS), also called field-asymmetric waveform ion mobility spectrometry (FAIMS), can provide a continuous-ion monitoring, and an orthogonal ion mobility, resulting in a better separation in shotgun lipidomics [128, 129].

In DMS method the lipids are ionized by electrospray ionization (ESI), and filtered by DMS cell prior to MS analysis [128]. A high-voltage asymmetric waveform is applied across two planar electrodes in DMS cell, and the difference between the mobility during the high- and low-field portions of the waveform determines the exact trajectory taken by the ions. Thus, DMS allows the evaluation of isobaric and closely related lipids, and quantification of monitored species. Another method using stable isotope-labelled internal standards, solid-phase extraction and ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UHPLC-ESI-QTOF-MS) was able to identify and quantify different congeners of *N*-acylethanolamides (NAEs) family, in which anandamide belongs [126]. Taken into account, these successful methods could be used in lipidome analysis from schizophrenia patients to better understand the endocannabinoid disturbances with high accuracy. Additionally, these methods could be applied to study endocannabinoids as biomarkers for treatment response of antipsychotics.

Although, DMS method is one of the most accurate for lipidome profile, some studies have reported success approaches for quantification of the lipid-based endocannabinoids. Kingsley and Marnett (2003) described that anandamide and 2-AG of mammalian tissues can be quantified using ESI/LC-MS/MS [130]. Recently, a high sensitivity microflow LC approach with detection by quadrupole MS/MS was reported to quantify the levels of endocannabinoids [131]. Another group measured endocannabinoid levels in rat brain using LC-MS/MS with electrospray positive ionization and MRM (also termed selective reaction monitoring) [132].

Several studies have shown changes in endocannabinoid levels in schizophrenia, employing several distinct MS-based methods (Table 5). A study using high-performance LC-MS showed that anandamide levels in plasma were higher in patients compared to healthy subjects [133], while increased levels of anandamide and palmitylethanolamide were detected in the cerebrospinal fluid in schizophrenia patients, using LC-MS and isotope dilution GC-MS [134]. These findings have been

supported by other investigations using LC-MS/MS, which confirmed the occurrence of increased anandamide levels in schizophrenia [135-138]. Interestingly, psychotic symptoms were negatively correlated with anandamide levels [134], suggesting a protective or antipsychotic profile of this endocannabinoid [135]. Another study reported that the increase in anandamide levels in schizophrenia seems to be a homeostatic mechanism to counteract the hyper dopamine neurotransmission [135].

According to these findings, CBD attenuated the schizophrenia symptoms, and this effect was associated with increased anandamide levels [8]. Additionally, anandamide levels were found to be increased in blood samples of schizophrenia patients, and this alteration was attenuated after clinical remission with antipsychotic treatment [139]. Corroborating with these findings, a recent study reported higher levels of anandamide and palmitoylethanolamide in twin pairs discordant for schizophrenia, compared to healthy twins [140]. These studies point to anandamide as a potential biomarker for risk of developing psychosis, and for monitoring antipsychotic treatment responses in patients.

In addition to serum and cerebrospinal fluids, *postmortem* brain samples (cerebellum, hippocampus and prefrontal cortex) from schizophrenia patients and control subjects have also been analyzed by lipidomic approaches [141]. This study quantified endocannabinoid levels using the LC-MS detection and the analyses showed that schizophrenia patients had higher levels of 2-AG and lower levels of anandamide in all brain regions analyzed, while docosahexaenylethanolamine (DHEA) and dihomogamma-linolenylethanolamine (LEA) levels were found to be decreased in some brain regions compared to controls. Interestingly, this study found changes between antipsychotic-free and antipsychotic-treated at time of death. For instance, 2-AG levels of antipsychotic-treated patients did not differ from those of healthy individuals, suggesting a modulation of treatment in endocannabinoid signaling [141]. Although, the measurement of endocannabinoids in *postmortem* samples can be limited. Another study highlighted the complexity of analyzing endocannabinoid levels in brain samples of variable *postmortem* delay [142]. Thus, this factor should be considered in the design and analysis of lipidomic data from *postmortem* studies, as should be the case for all molecular and structural studies of the brain and other tissues obtained in this manner.

Preclinical studies have also shown changes in the lipid-based cannabinoid levels in models of psychiatric disorders. A lipidomic profiling study detected decreased

levels of anandamide and 2-AG in the ventral striatum of rodents submitted to bilateral olfactory bulbectomy, an animal model to study schizophrenia [143]. Additionally, the results of the LC-MS analyses were associated with behavioral tests, suggesting that the dysregulation mainly in 2-AG levels plays a role in the altered locomotor activity. Likewise, studies using isotope dilution-LC-atmospheric pressure chemical ionization-MS showed that the brain regions of rats treated with phencyclidine (PCP) [144] and animals submitted to the social isolation rearing have altered anandamide and 2-AG levels [145]. Moreover, the GC-chemical ionization MS approach using an isotope dilution assay detected increased or decreased anandamide levels, depending on the brain region analyzed, from PCP-treated rats [55, 56]. Another group showed increased anandamide concentrations, and decreased or increased in 2-AG concentrations in some brain areas Nrg1 mouse model of schizophrenia [146]. Together the lipid profiles found by these studies point to role of anandamide and 2-AG in schizophrenia-like behavior.

Although important lipidomic findings have shown the involvement of endocannabinoid changes in the pathophysiology of schizophrenia, more efforts are needed to clarify the effects of phytocannabinoids in this field, since these compounds modulate enzymatic pathways of synthesis and hydrolyses of anandamide and 2-AG. For instance, a study reported that antipsychotic properties of CBD occurs mainly through the enzymatic blocking of FAAH, but the direct interaction of this phytocannabinoid with CB1, CB2, or TRPV1 receptors may not be excluded [8]. The same group used LC/MS to measure anandamide levels in CFS from first episode schizophrenia patients under low or high-*Cannabis* exposure. The authors found that high frequency abuse down-regulated anandamide levels [136], suggesting that Δ^9 -THC can impair endocannabinoid levels. However, the molecular pathways involved are not clear in these results. Thus, proteomic-related techniques could fill these gaps.

Endocannabinoid system and other brain disorders

Besides schizophrenia, endocannabinoids have been implicated in other multifactorial psychiatric disorders, for instance depression and anxiety. Depression is the most common psychiatric disorder and can have a severe impact on quality of life. Clinical and preclinical evidence have shown that CB1 blockade or deletion result in depression-like behavior [147, 148, 149], while increased endocannabinoid levels

[150, 151, 152, 153] or exogenous CB1 agonists [154] are a potential antidepressant treatment. In the case of anxiety, cannabinoid agonists have both anxiolytic and anxiogenic effects depending on the dose used [155, 156]. In addition, genetic or pharmacological manipulation of FAAH decreases anxiety-like behavior [157, 158, 159] and manipulation of DAGL α or MAGL activity, which results in decreased 2-AG levels, also plays a role in anxiety [160, 161, 162].

Endocannabinoids have also been implicated in other brain disorders such as multiple sclerosis (MS) and Parkinson's disease (PD). In MS, cannabinoids provide a management of tremor as well as spasticity, neurodegenerative and neuroinflammatory processes in preclinical studies [163, 164, 165, 166, 167]. Several lines of evidence also support the role of cannabinoids in the treatment of MS as reviewed by Rog [168]. With respect to PD, the endocannabinoids are closely related to control of motor activity in the brain [169]. This finding has generated new prospects about treatment of PD [170, 171, 172].

Taken together these data reinforce the potential of endocannabinoid targets to treat not only schizophrenia, but also other brain disorders. Additionally, further investigations regarding endocannabinoid levels in serum or cerebrospinal fluid could clarify the role of these compounds in brain disorders as well as identify biomarkers for disease diagnosis and progression. Moreover, proteome investigations could fill the knowledge gap about pathways and biological processes involved in the effects of cannabinoids in these diseases. Finally, the endocannabinoid system deserves attention from omics-related studies on several conditions and not only schizophrenia as highlighted here.

Conclusions

There has been an increasing interest in potential dysfunctions of the endocannabinoid system in multiple brain diseases, but many aspects of endocannabinoid functions in the brain have not been completely elucidated. In this regard, the application of proteomic, lipidomic, and metabolomics studies could provide further knowledge about the role of the endocannabinoid system in healthy brain function, as well as how disturbances in this system could contribute to psychiatric disorders. These technologies have the advantage over traditional methods by providing a screening or profiling service as opposed to targeted approaches, which rely on prior

knowledge. However, from all of these methods combined, the endocannabinoid enzymes and receptors have come under increased scrutiny as potential targets for improved treatment of some brain disorders. This may prove to be fruitful as it has been known for decades that some patients suffering from schizophrenia actually seek to self-medicate with *Cannabis* and other substances, and this may help to alleviate certain psychiatric symptoms and emotional distresses [173, 174]. Whether or not such self-medication is truly beneficial, these observations still support the involvement and continued investigation of the endocannabinoid pathway as a potential source of biomarkers and drug targets for psychiatric diseases.

The protein constituents of the endocannabinoid pathway have been investigated by several proteomic studies that used MS and other differential display approaches. The consensus of these studies showed that not only the proteins abundance must be considered in endocannabinoid signaling, but also their functional state, cellular compartment, post-translational regulation, and potentially their differential expression across different cell types and brain regions. MS is also widely used in lipidomic studies of anandamide and 2-AG. The direct investigation of endocannabinoid levels by several studies has confirmed a role of these compounds in the pathophysiology of these disorders. The lipidomic findings suggest that anandamide can be a potential biomarker for schizophrenia, which prove useful for improved stratification of patients, and to monitor the responses to antipsychotic treatments. In turn, this may lead to improved treatment of individuals suffering with this, and potential other, psychiatric disorders.

Acknowledgements:

Authors thank FAPESP (Sao Paulo Research Foundation) for funding our research (grants 2013/08711-3, 2014/10068-4, 2017/18242-1 and 2018/03673-0), Serrapilheira Institute (grant number Serra-1709-16349), CNPq (The Brazilian National Council for Scientific and Technological Development, grant 460289/2014-4) and CAPES (Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel, for grant scholarship 1656470 and 1691474).

Conflict of interest statement: The authors have declared no conflict of interest.