



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

LÍVIA RAMOS DA SILVA

**ANÁLISE DA REATIVIDADE DE ASTRÓCITOS E PERFIL
PROTEÔMICO DE CAMUNDONGOS EXPOSTOS À CUPRIZONA E
TRATADOS COM O ANTIPSICÓTICO CLOZAPINA**

**ANALYSIS OF ASTROCYTE REACTIVITY AND PROTEOMIC
PROFILE OF MICE EXPOSED TO CUPRIZONE AND TREATED
WITH THE ANTIPSYCHOTIC CLOZAPINE**

CAMPINAS

2024

LÍVIA RAMOS DA SILVA

**ANÁLISE DA REATIVIDADE DE ASTRÓCITOS E PERFIL
PROTEÔMICO DE CAMUNDONGOS EXPOSTOS À CUPRIZONA E
TRATADOS COM O ANTIPSICÓTICO CLOZAPINA**

**ANALYSIS OF ASTROCYTE REACTIVITY AND PROTEOMIC
PROFILE OF MICE EXPOSED TO CUPRIZONE AND TREATED
WITH THE ANTIPSYCHOTIC CLOZAPINE**

*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 Molecular e
Morfofuncional, na área de Bioquímica.*

*Dissertation presented to the Institute of
Biology of the University of Campinas in
partial fulfillment of the requirements for
the degree of Master in Morphofunctional
and Molecular Biology in the area of
Biochemistry.*

Orientador: DANIEL MARTINS DE SOUZA

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE A
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA
PELA ALUNA LÍVIA RAMOS DA SILVA E
ORIENTADA PELO PROFESSOR DOUTOR
DANIEL MARTINS DE SOUZA.

CAMPINAS
2024

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)
Biblioteca do Instituto de Biologia
Gilberto Martins Vicentin - CRB 8/8620

R147a Ramos-da-Silva, Livia, 1994-
Análise da reatividade de astrócitos e perfil proteômico de camundongos
expostos à cuprizona e tratados com o antipsicótico clozapina / Livia Ramos da
Silva. – Campinas, SP : [s.n.], 2024.

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

1. Resposta imune. 2. Astrócitos. 3. Proteômica. 4. Clozapina. I. Martins-
de-Souza, Daniel, 1979-. II. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).
Instituto de Biologia. III. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Analysis of astrocyte reactivity and proteomic profile of mice
exposed to cuprizone and treated with the antipsychotic clozapine

Palavras-chave em inglês:

Immune response

Astrocytes

Proteomics

Clozapine

Área de concentração: Bioquímica

Titulação: Mestra em Biologia Molecular e Morfofuncional

Banca examinadora:

Daniel Martins de Souza [Orientador]

Adriano Silva Sebollela

Cecilia Hedin Pereira

Data de defesa: 12-06-2024

Programa de Pós-Graduação: Biologia Molecular e Morfofuncional

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

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-4899-0771>

- Currículo Lattes do autor: <https://lattes.cnpq.br/4866345360042922>

Campinas, 12 de junho de 2024

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Daniel Martins de Souza

Prof. Dr. Adriano Silva Sebollela

Prof.(a) Dr(a). Cecilia Hedin Pereira

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

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa de Biologia Molecular e Morfofuncional da Unidade Instituto de Biologia.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) - Código de Financiamento 160231/2021-3.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - 160231/2021-3) pelo apoio ao presente trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - 2017/25588-1), pelos financiamentos que possibilitam a pesquisa no Laboratório de Neuroproteômica (LNP).

Ao meu orientador, Prof. Dr. Daniel Martins de Souza, pela oportunidade de realizar minha iniciação científica e mestrado no laboratório. Pelas oportunidades de participação em congressos, cursos, colaborações, artigos e capítulos. Pelos bolos e cafés da tarde, que traziam alívio no dia-a-dia corrido do laboratório. A passagem pelo LNP foi uma enorme oportunidade de conhecer e viver a ciência brasileira, além de me proporcionar crescimento pessoal e profissional significativos.

À minha co-orientadora, Dr. Fernanda Crunfli, por todo apoio, orientação, conselhos, discussões e companhia nos experimentos. Pela dedicação à minha formação e troca de saberes. Pela defesa da união e coletividade no ambiente de trabalho. Também pela amizade sincera e leve. Te admiro profundamente e agradeço por ser esse exemplo incrível de cientista dedicada, proativa e fiel a seus princípios. Sempre a terei como uma grande referência de mulher e cientista.

Aos meus colegas de laboratório, pela companhia, ensinamentos e discussões, tanto acadêmicas, quanto pessoais. A convivência diária com vocês foi fundamental ao longo desses anos. Agradeço em especial à Dr^a. Carol Brandão, pela sinceridade e aceitação, trocas de saberes científicos e de vida, ajuda nos experimentos, protocolos, café da tarde e conselhos, tanto profissionais, quanto pessoais; à Dr^a. Talita Vrechi, minha irmã siamesa, e à Júlia Crisóstomo, pela parceria durante a fase final e mais difícil do mestrado, pelas voltas no jardim da Prof. Dr^a Maria do Carmo, no Instituto de Biologia, pelas idas aos pés de jambolão e cafés de Barão Geraldo; ao Vítinho (Dr. Vitor Corasolla) pelas orientações com o massas, ajuda com cálculos estatísticos, discussões políticas e piadas de tiozão; ao Brad, pelos cookies norte americanos tradicionais, comidas indianas, bolos e jogos de mesa, além da ajuda e dicas referentes à língua inglesa. Também agradeço à Aline Valença, por me iniciar na prática da cultura celular e ter paciência em me ensinar os cálculos corriqueiros dos experimentos. A todas e a todos aqui citados, meus sinceros agradecimentos também pelas incontáveis risadas. A vida no laboratório foi mais divertida na presença de vocês.

Aos meus amigos e amigas de longa data, que fizeram essa caminhada mais leve e feliz. Agradeço por serem uma família paralela, que me acolheu, ouviu, apoiou e suportou. À

Beatriz Daniela, que me socorreu no ponto de ônibus e me levou aos 45 do segundo tempo na UNICAMP para realizar minha matrícula no curso de graduação. Sem você, minha amiga, nem a graduação eu teria. Minha eterna gratidão por sua amizade e carinho em tantas fases da minha vida. Desde a 5ª série você tem sido uma parceira leal e verdadeira. Ao Gustavo Bernardo, Mafê, Paulo, Vanessa e Samara, um agradecimento especial por constituírem comigo a Rep CDP, nosso lar em Campinas onde vivemos anos dourados, recheados de brigadeiro, pipoca, chá, vinhos, tantas comidas gostosas e gastação. Crescemos muito umas com as outras e passamos a pior fase do mundo em união, segurando uma barra que atravessou cada uma de uma maneira. Enfrentar a pandemia da COVID19 não foi nem um pouco fácil, mas vocês converteram esse momento de terror em algo mais fácil de ser suportado. Ao Gerson, por ser uma grande inspiração na ciência e na vida, por me apresentar pratos finos e deliciosos que eu nunca havia tido acesso. À Thainá, pelas incontáveis cervejas no Tábuas e lealdade, apesar dos altos e baixos. À Vanessa e Thainá, também sou grata pela partilha das angústias e sofrimento em sermos mulheres periféricas em uma universidade extremamente elitizada. Nossos papos e o apoio de vocês sempre me fortaleceram e ajudaram e não me sentir sozinha na jornada árdua de conquistar meu diploma e título.

Ao Jota, uma das pessoas mais importantes da minha vida, que viveu cada fase e momento ao meu lado, me apoiando, consolando e não me deixando desistir. Agradeço por acreditar fielmente em mim e no meu potencial. Em cada página desta dissertação, tem um pouquinho de você, que me abraçou, ajudou, aconselhou, alimentou e acalentou, em cada crise e em cada ciclo, nos dias bons, e especialmente nos ruins. Sou grata pela orientação, discussões de dados, discussões científicas, suporte com as análises no R e partilha de vida. Seu amor é mais verde que o verde das folhas do loureiro.

Aos meus pais, Aparecida Ramos e João Aniceto, que mesmo sem entender muito bem o que eu estava fazendo, nunca desacreditaram da minha trajetória. Sempre me apoiando de todas as formas possíveis ao longo dessa caminhada. Obrigada por serem tão incríveis e por, através de suas histórias de vida, me impulsionar a buscar uma vida melhor. Agradeço também ao meu sobrinho Yan, que mesmo sendo uma criança, foi em incontáveis momentos o meu gatilho de vida; que sem saber, me ajudou a converter o ódio, a dor, a angústia, a ansiedade e o medo em movimento de busca por dias melhores e enfrentamento dos dias ruins. Muito disso foi e é por você, menor. Espero de verdade conseguir um dia te proporcionar uma vida melhor e mais leve. Agradeço também à minha irmã Giovana, que segurou as pontas mais duras em casa para que eu pudesse trilhar mais confortavelmente a minha trajetória. E que também foi quem nos concebeu a dádiva de ter o Yan entre nós. Muito obrigada, minha irmã, pelo seu sacrifício, ao qual eu não romantizo, mas reconheço. Isso aqui também é por você e espero poder retribuí-la de alguma forma um dia.

À todas e todos, minha eterna e mais sincera gratidão.

“E chora, doutor. Tem que respeita porque nois respeito.
São poucos que chega onde nois chegou. Com a caneta e ca' folha no que nois passou.
Pra chegar ate aqui não matou, nem roubou. Tem sido difícil, mas não abalou.
Quem veio do nada, tudo em volta é pouco. Eu quero tudo e sei o que for de valor.”

Música: Chora Doutor - Jovem MK

RESUMO

Os astrócitos são células gliais que desempenham um papel crucial na fisiologia e estrutura do sistema nervoso central. A reatividade dos astrócitos é uma resposta defensiva complexa, heterogênea e específica ao contexto patológico, resultando em alterações moleculares, morfológicas e funcionais. A cuprizona é uma neurotoxina amplamente utilizada para estudar anormalidades das células da glia, desmielinização e condições neuroinflamatórias observadas na esclerose múltipla. Além disso, diversos estudos mostram que a reatividade dos astrócitos é uma característica marcante deste modelo. A clozapina é um antipsicótico de segunda geração utilizado principalmente para manejar os sintomas de pacientes refratários ao tratamento da esquizofrenia e têm como um possível mecanismo de ação a interação e modulação de astrócitos. Entretanto, estudos que buscam investigar o envolvimento deste fármaco na modulação da reatividade de astrócitos ainda são escassos. Sendo assim, o objetivo deste projeto foi avaliar, em modelo animal, se a modulação do perfil de reatividade de astrócitos é um dos mecanismos relacionados ao efeito terapêutico da clozapina, bem como quais outros mecanismos moleculares estão associados aos efeitos terapêuticos deste fármaco. Para isso, foram utilizados camundongos C57BL/6 machos expostos por 5 semanas à cuprizona, sendo 2 semanas de tratamento com clozapina 10mg/kg via i.p. a partir da 3ª semana de exposição. Além das análises comportamentais conduzidas nestes animais, amostras de seus cérebros foram analisadas quanto à sua expressão gênica por RT-qPCR e proteômica. Nossos resultados mostraram que a cuprizona resulta em prejuízos na memória e interação social dos animais, além de ocasionar um aumento significativo na expressão da maioria dos genes associados ao perfil reativo dos astrócitos no córtex pré-frontal, córtex e hipocampo dos camundongos. O tratamento com clozapina reverteu os déficits de memória e interação social causados pela cuprizona, mas não foi capaz de reduzir a expressão dos genes relacionados à reatividade dos astrócitos. Apesar disso, análises qualitativas por imunofluorescência indicaram uma tendência de redução na expressão da proteína GFAP na sub-região CA3 do hipocampo. Nossas análises proteômicas revelaram que o tratamento com clozapina alterou significativamente a expressão de proteínas envolvidas em vias como fosforilação oxidativa, autofagia, ferroptose e sistema endocanabinóide no córtex e/ou hipocampo dos animais. Portanto, os resultados obtidos sugerem uma possível ação modulatória da clozapina sobre a reatividade astrocitária induzida pela cuprizona e fornecem informações sobre proteínas e vias bioquímicas que podem contribuir para a compreensão dos mecanismos moleculares de sua ação e, possivelmente, para sua eficácia.

ABSTRACT

Astrocytes are glial cells that play a crucial role in the physiology and structure of the central nervous system. Astrocyte reactivity is a complex, heterogeneous, and context-specific defensive response, resulting in molecular, morphological, and functional alterations. Cuprizone is a neurotoxin widely used to study abnormalities of glial cells, demyelination, and neuroinflammatory conditions observed in multiple sclerosis. Furthermore, several studies show that astrocyte reactivity is a hallmark feature of this model. Clozapine is a second-generation antipsychotic used to manage symptoms in treatment-resistant schizophrenia patients, with its possible mechanism of action involving interaction and modulation of astrocytes. However, studies investigating the involvement of this drug in modulating astrocyte reactivity are still scarce. Therefore, the aim of this project was to evaluate, in an animal model, whether modulation of astrocyte reactivity profile is one of the mechanisms related to the therapeutic effect of clozapine, as well as to identify other molecular mechanisms associated with the therapeutic effects of this drug. Male C57BL/6 mice were exposed to cuprizone for 5 weeks, with 2 weeks of clozapine treatment (10 mg/kg, i.p.) starting from the 3rd week of exposure. In addition to behavioral analyses conducted in these animals, samples of their brains were analyzed for gene expression by RT-qPCR and proteomics. Our results showed that cuprizone resulted in impairments in memory and social interaction of the animals, as well as a significant increase in the expression of most genes associated with the reactive astrocyte profile in the prefrontal cortex, cortex, and hippocampus of the mice. Clozapine treatment reversed the memory and social interaction deficits caused by cuprizone, but it was not able to reduce the expression of genes related to astrocyte reactivity. However, qualitative analyses by immunofluorescence indicated a trend towards reduced expression of the GFAP protein in the CA3 sub-region of the hippocampus. Our proteomic analyses revealed that clozapine treatment significantly altered the expression of proteins involved in pathways such as oxidative phosphorylation, autophagy, ferroptosis, and the endocannabinoid system in the cortex and/or hippocampus of the animals. Therefore, the results obtained suggest a possible modulatory action of clozapine on cuprizone-induced astrocyte reactivity and provide information about proteins and biochemical pathways that may contribute to understanding the molecular mechanisms of its action and possibly its efficacy.

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1: Comunicação astrócito-neuronal no ambiente ativo (“*active milieu*”). O conceito de ambiente ativo integra múltiplas teorias que abordam diferentes aspectos da organização funcional local do cérebro, como sinapse multipartida, unidade neuro(glio)vascular, sinalização extra sináptica e transmissão de volume. O ambiente ativo é formado por interações dinâmicas entre elementos neuronais (soma, axônios, dendritos e espinhas dendríticas), elementos celulares não neuronais (processos astrocíticos e microgliais), vasculatura (capilar), espaço extracelular (ECS) e matriz extracelular (ECM). Em um ambiente ativo, as sinapses podem se contatar, sinalizar e ser controladas homeosticamente por ramos astrocíticos (a), por uma ou várias “folhas” (b). Um único ramo ou folha astrocítica pode ser contatado por várias sinapses (c). Mudanças dinâmicas na morfologia dos processos astrocíticos afetam as barreiras de difusão, a depuração de neurotransmissores, a dinâmica de K^+ e o fornecimento de glutamina ou substratos energéticos, regulando assim a plasticidade neuronal. Os processos astrocíticos formam estruturas em forma de laço por meio de junções gap (GJs) recíprocas. Imagem retirada de (Semyanov and Verkhratsky, 2021).

Figura 1.1: Detecção da reatividade astrocitária através da expressão da proteína do filamento intermediário GFAP. (A) Imunodeteção de GFAP (verde) em astrócitos não reativos no hipocampo de camundongo (à esquerda) e astrócitos reativos no hipocampo de camundongo 4 dias após a lesão do córtex entorrinal, estes últimos com claros sinais de hipertrofia dos processos astrocitários marcados com GFAP (à direita). (B) Esquema da resposta dos astrócitos à lesão. Os processos dos astrócitos reativos tornam-se mais espessos e, portanto, visíveis a uma distância maior quando visualizados com anticorpos contra GFAP. Em lesões pontuais do SNC, os astrócitos adjacentes à lesão podem se comportar de maneira diferente: eles também exibem hipertrofia dos processos, mas muitas vezes mostram uma extensão proeminente de seus processos celulares em direção à lesão, o que implica no rearranjo de seus domínios. Imagem retirada de (Pekny, Wilhelmsson and Pekna, 2014).

Figura 1.2: Astrócitos no estado não reativo, em condições normais e em estado reativo, em condições inflamatórias. (A) Os astrócitos interagem com neurônios, oligodendrócitos, microglia e células da barreira hematoencefálica (BHE) em condições normais. (B) Interações sinápticas (sinapses tripartites) dos astrócitos com neurônios regulando a transmissão sináptica através do suporte metabólico e da remoção de neurotransmissores. (C) Os “pés” dos astrócitos acompanham a vasculatura cerebral e são um constituinte da BHE, limitando assim a infiltração de patógenos e células imunes periféricas no SNC. Seus “pés” expressam aquaporina-4 e formam uma interação próxima com pericitos e a lâmina basal do parênquima cerebral. (D) Durante condições inflamatórias, astrócitos reativos secretam uma miríade de mediadores inflamatórios que regulam as funções de células mieloides, linfócitos, oligodendrócitos, neurônios e micróglia. (E) Mediadores inflamatórios solúveis derivados de micróglia e outras células imunes induzem diferencialmente funções patogênicas (vermelho) ou protetoras (azul) dos astrócitos. (F) Células imunes periféricas invadem a BHE durante condições inflamatórias e transgridem para o SNC. C1q, Componente 1q do complemento; IL-1 β , Interleucina-1 β ; IL-10, Interleucina 10; TNF- α , Fator de necrose tumoral α ; TGF- α , Fator de crescimento transformador α ; VEGF-B, Fator de crescimento endotelial vascular B. Imagem retirada de (Linnerbauer and Rothhammer, 2020).

Figura 1.3: Estrutura química 2D da clozapina. Imagem retirada do site PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Clozapine#section=2D-Structure>).

Figura 1.4: Visão lateral do cérebro do camundongo (C57BL/6). O córtex cerebral de roedores possui superfície lisencefálica. Imagem retirada de (Schröder, Moser and Huggenberger, 2020).

Figura 1.5: Representação esquemática do córtex pré-frontal de camundongos em vista mediossagital. Na direção dorsoventral, as áreas frontais 2, córtex cingulado anterior (parte dorsal), pré-límbico, infra-límbico e córtex orbital medial estão dispostas. Posterior ao córtex pré-límbico, encontra-se o córtex cingulado anterior (parte ventral). Imagem retirada de (Schröder, Moser and Huggenberger, 2020).

Figura 1.6: Anatomia comparada do hipocampo de roedores e humanos. A) Diferença da disposição entre roedores (dorsal-ventral) e humanos (anterior-posterior). B) Posição do hipocampo e do córtex entorrinal (EC) no cérebro de roedores e humanos. C) Esquema das

seções transversais de tecido corado pela técnica de Nissl em hipocampo de roedores e humanos. Adaptado de (Strange *et al.*, 2014).

MÉTODOS

Figura 2: Imagem ilustrativa representando os 4 grupos experimentais. (A) Os camundongos C57BL/6 do grupo Controle (CTL) e Clozapina (CLZ) receberam alimentação padrão (ração moída) por 5 semanas e aplicação i.p. da solução veículo no grupo CTL e clozapina (10mg/kg) no grupo CLZ, por 2 semanas a partir da 3^a semana de alimentação padrão. (B) Os camundongos C57BL/6 do grupo Cuprizona (CUP) e Cuprizona+Clozapina (CUP+CLZ) receberam ração moída misturada com cuprizona em uma concentração final de 0,2% por 5 semanas e aplicação i.p. da solução veículo no grupo CUP e clozapina (10mg/kg) no grupo CUP+CLZ, por 2 semanas a partir da 3^a semana de exposição à cuprizona.

Figura 2.2: Esquema com vista lateral do cérebro do camundongo C57BL/6 ilustrando as regiões coletadas para análise de RT-qPCR e proteômica. As linhas tracejadas delimitam as regiões coletadas na matriz de corte: em preto, córtex pré-frontal (CPF); amarelo, córtex (CTX); vermelho, hipocampo (HPC).

RESULTADOS

Figura 3: Avaliação da locomoção através do teste de Campo Aberto após 3 semanas de exposição à cuprizona. (A) Total da distância percorrida na arena, (B) média da velocidade de locomoção do animal. Número de entradas na (C) periferia e (D) no centro da arena. Tempo de permanência na (E) periferia e no (F) centro da arena. Total da distância percorrida na (G) periferia e no (H) centro da arena. O teste foi realizado 3 semanas após a exposição à cuprizona. Os dados estão expressos como média \pm E.P.M. Teste t com correção de Welch. * $p < 0,05$ comparado com o grupo Controle (n= 5-7 animais por grupo).

Figura 3.1: Avaliação da locomoção através do teste de Campo Aberto após 5 semanas de exposição à cuprizona. (A) Total da distância percorrida na arena e (B) média da velocidade de locomoção do animal. Número de entradas na (C) periferia e (D) no centro da arena. Tempo de permanência na (E) periferia e no (F) centro da arena. Total da distância percorrida na (G) periferia e no (H) centro da arena. O teste foi realizado em 5 semanas de

exposição à cuprizona. Os dados estão expressos como média \pm E.P.M. Teste t com correção de Welch. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ comparado com o grupo Controle (n= 5-7 animais por grupo).

Figura 3.2: Avaliação do reconhecimento de objeto e interação social após 5 semanas de exposição à cuprizona. (A) Memória de curta duração e (B) longa duração. (C) Interação social. Os dados estão expressos como média \pm E.P.M. do índice de discriminação (n=3-5 animais por grupo). Teste t com correção de Welch. * $p < 0,05$; **** $p < 0,001$ comparado com o grupo Controle (n= 5- 7 animais por grupo).

Figura 3.3: Avaliação da mediana e média de intensidade de fluorescência para MBP através da citometria de fluxo no hipocampo. Os dados estão expressos como média \pm E.P.M. Teste t com correção de Welch. ** $p < 0,01$ comparado com o grupo Controle (n= 3-5 animais por grupo). Estratégia de marcação da análise para MBP+ (SSC-A vs APC-A), através da técnica de citometria de fluxo.

Figura 3.4: Avaliação da locomoção através do teste de Campo Aberto após 2 semanas de tratamento com clozapina 10mg/kg via i.p a partir da 3ª semana de exposição à cuprizona. O gráfico expressa (A) distância percorrida, (B) velocidade, (C) tempo de permanência no centro e (D) tempo de permanência na periferia. Os dados estão expressos como média \pm E.P.M. Teste t com correção de Welch (n= 5-8 animais por grupo).

Figura 3.5: Avaliação do Reconhecimento de Objetos após tratamento com clozapina. (A) memória de curta duração e (B) memória de longa duração após 2 semanas de tratamento com clozapina 10mg/kg via i.p a partir da 3ª semana de exposição à cuprizona. Os dados estão expressos como média \pm E.P.M. (n= 3-5 animais por grupo). ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Tukey. ** $p < 0,01$ e **** $p < 0,0001$ comparado com o grupo Controle; # $p < 0,05$ e ## $p < 0,01$ comparado com o grupo cuprizona (CUP).

Figura 3.6: Avaliação do teste de Interação Social após 2 semanas de tratamento com clozapina 10mg/kg via i.p a partir da 3ª semana de exposição à cuprizona. Os dados estão expressos como média \pm E.P.M. (n=6-13 animais por grupo). ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Tukey. ** $p < 0,01$ e **** $p < 0,0001$ comparado com o grupo Controle; # $p < 0,05$ comparado com o grupo CUP.

Figura 4: Expressão de RNAm dos genes marcadores da reatividade de astrócitos no córtex após 5 semanas de exposição à cuprizona, sendo 2 semanas de tratamento com clozapina 10mg/kg via i.p. a partir da 3ª semana de exposição. Os níveis de expressão de RNAm de cada gene foram normalizados com a média geométrica dos controles endógenos Actb e Hprt. Os dados foram representados como média ± E.P.M., n = 4-8 animais por grupo. Anova de duas-vias seguido de pós-teste de Tukey. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0.001, ****p<0,0001 comparado com o grupo controle; #p<0,05, ##p<0,01, ###p<0.001, ####p<0,0001 comparado com o grupo CLZ.

Figura 4.1: Expressão de RNAm dos genes marcadores da reatividade de astrócitos no córtex pré-frontal. após 5 semanas de exposição à cuprizona, sendo 2 semanas de tratamento com clozapina 10mg/kg via i.p. a partir da 3ª semana de exposição. Os níveis de expressão de RNAm de cada gene foram normalizados com a média geométrica dos controles endógenos Actb e Hprt. Os dados foram representados como média ± E.P.M., n = 4-8 animais por grupo. Anova de duas-vias seguido de pós-teste de Tukey. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0.001, ****p<0,0001 comparado com o grupo controle; #p<0,05, ##p<0,01, ###p<0.001, ####p<0,0001 comparado com o grupo CLZ.

Figura 4.2: Expressão de RNAm dos genes marcadores da reatividade de astrócitos no hipocampo após 5 semanas de exposição à cuprizona, sendo 2 semanas de tratamento com clozapina 10mg/kg via i.p. a partir da 3ª semana de exposição. Os níveis de expressão de RNAm de cada gene foram normalizados com a média geométrica dos controles endógenos Actb e Hprt. Os dados foram representados como média ± E.P.M., n = 4-8 animais por grupo. Anova de duas-vias seguido de pós-teste de Tukey. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0.001, ****p<0,0001 comparado com o grupo controle; #p<0,05, ##p<0,01, ###p<0.001, ####p<0,0001 comparado com o grupo CLZ.

Figura 5: Expressão de GFAP na região CA3 do hipocampo em secção coronal após 5 semanas de exposição à cuprizona, sendo 2 semanas de tratamento com clozapina 10mg/kg via i.p. a partir da 3ª semana de exposição. (A) Figura esquemática do hipocampo (HPC) marcando em verde região CA3 onde a reatividade dos astrócitos foi analisada. (B) Astrócitos marcados com anticorpo anti-GFAP (em verde) nas condições controle (VEI),

cuprizona (CUP) e cuprizona+clozapina (CUP_CLZ). Núcleos celulares marcados com DAPI (em azul). Escala: 100µm. n = 3.

Figura 6: Distribuição das proteínas diferencialmente reguladas. (A) Total de proteínas quantificadas e diferencialmente expressas no córtex (CTX), hipocampo (HPC) e totais (CTX+HPC), de camundongos após 5 semanas de exposição à cuprizona. (B) Total de proteínas quantificadas e diferencialmente expressas no córtex (CTX), hipocampo (HPC) e totais (CTX+HPC), de camundongos tratados com clozapina 10mg/kg via i.p. por 2 semanas a partir da 3ª semana de exposição à cuprizona por 5 semanas. Córtex (CTX) representado em azul e hipocampo (HPC) representado em rosa.

Figura 6.1: Distribuição das proteínas diferencialmente reguladas. (A) Total de proteínas mais e menos expressas, no córtex (CTX), em azul, e hipocampo (HPC), em vermelho, de camundongos após 5 semanas de exposição à cuprizona. (B) Total de proteínas infra- e supra-reguladas, no córtex (CTX), em azul, e hipocampo (HPC), em vermelho, de camundongos tratados com clozapina 10mg/kg via i.p. por 2 semanas a partir da 3ª semana de exposição à cuprizona por 5 semanas.

Figura 6.2: Gráfico UpSet mostrando a intersecção das proteínas diferencialmente expressas após exposição à cuprizona. As barras na vertical mostram a quantidade de proteínas diferencialmente expressas exclusivamente em cada região e a intersecção. As proteínas diferencialmente expressas em comum em cada região é representada pela interligação das duas regiões pela linha vertical. As barras na horizontal mostram o conjunto total de proteínas diferencialmente expressas em cada região. Em azul, hipocampo (HPC) e em rosa, córtex (CTX).

Figura 6.3: Gráfico UpSet mostrando a intersecção das proteínas diferencialmente expressas após tratamento com a clozapina. As barras na vertical mostram a quantidade de proteínas diferencialmente expressas exclusivamente em cada região e a intersecção. As proteínas diferencialmente expressas em comum em cada região é representada pela interligação das duas regiões pela linha vertical. As barras na horizontal mostram o conjunto total de proteínas diferencialmente expressas em cada região. Em azul, hipocampo (HPC) e em rosa, córtex (CTX).

Figura 7: As 33 principais vias bioquímicas enriquecidas (*Elsevier pathway collection*) no córtex (CTX) e hipocampo (HPC) de camundongos após exposição à cuprizona. A circunferência e cor dos círculos representam a relevância estatística da via em $-\log_{10}(p)$ sendo consideradas estatisticamente relevantes as vias com ANOVA ($p \leq 0.05$). Enriquecimento de vias através da base de dados *Elsevier pathway collection*.

Figura 7.1: Diagrama de cordas representando a localização e o nível de expressão das proteínas envolvidas na via de Glioblastoma e oligodendrócitos (ANOVA ($p \leq 0.05$) após exposição à cuprizona. As cores das proteínas indicam seus níveis de expressão em $2\log(\text{Fold Change})$, enquanto as cordas destacam se foram encontradas alteradas no hipocampo (HPC), em azul ou córtex (CTX), em rosa.

Figura 7.2: Diagrama de cordas representando a localização e o nível de expressão das proteínas envolvidas na via de Astrocitoma (ANOVA ($p \leq 0.05$) após exposição à cuprizona. As cores das proteínas indicam seus níveis de expressão em $2\log(\text{Fold Change})$, enquanto as cordas destacam se foram encontradas alteradas no hipocampo (HPC), em azul ou córtex (CTX), em rosa.

Figura 7.3: Diagrama de cordas representando a localização e o nível de expressão das proteínas envolvidas na via de Sinalizações por Glutamato (ANOVA ($p \leq 0.05$) após exposição à cuprizona. As cores das proteínas indicam seus níveis de expressão em $2\log(\text{Fold Change})$, enquanto as cordas destacam se foram encontradas alteradas no hipocampo (HPC), em azul ou córtex (CTX), em rosa.

Figura 7.4: As 21 principais vias bioquímicas enriquecidas (KEGG) no córtex (CTX) e hipocampo (HPC) de camundongos após exposição à cuprizona. A circunferência e cor dos círculos representam a relevância estatística da via em $-\log_{10}(p)$ sendo consideradas estatisticamente relevantes as vias com ANOVA ($p \leq 0.05$). Enriquecimento de vias através da base de dados *KEGG*.

Figura 7.5: Diagrama de cordas representando a localização e o nível de expressão das proteínas envolvidas na via de Fosforilação Oxidativa e Glicólise/Gliconeogênese (ANOVA ($p \leq 0.05$) após exposição à cuprizona. As cores das proteínas indicam seus

níveis de expressão em $2\log(\text{Fold Change})$, enquanto as cordas destacam se foram encontradas alteradas no hipocampo (HPC), em azul ou córtex (CTX), em rosa.

Figura 8: As 23 principais vias bioquímicas enriquecidas no córtex (CTX) e hipocampo (HPC) de camundongos após o tratamento com clozapina. A circunferência e cor dos círculos representam a relevância estatística da via em $-\log_{10}(p)$, sendo consideradas estatisticamente relevantes as vias com ANOVA ($p \leq 0.05$).

Figura 8.1: Diagrama de cordas representando a localização e o nível de expressão das proteínas envolvidas na via de Fosforilação oxidativa (ANOVA ($p \leq 0.05$) após tratamento com clozapina. As cores das proteínas indicam seus níveis de expressão em $2\log(\text{Fold Change})$, enquanto as cordas destacam se foram encontradas alteradas no hipocampo (HPC), em azul ou córtex (CTX), em rosa

Figura 8.2: Diagrama de cordas representando a localização e o nível de expressão das proteínas envolvidas na via de Autofagia (ANOVA ($p \leq 0.05$) após tratamento com clozapina. As cores das proteínas indicam seus níveis de expressão em $2\log(\text{Fold Change})$, enquanto as cordas destacam se foram encontradas alteradas no hipocampo (HPC), em azul ou córtex (CTX), em rosa

Figura 8.3: Diagrama de cordas representando a localização e o nível de expressão das proteínas envolvidas na via de Ferroptose (ANOVA ($p \leq 0.05$) após tratamento com clozapina. As cores das proteínas indicam seus níveis de expressão em $2\log(\text{Fold Change})$, enquanto as cordas destacam se foram encontradas alteradas no hipocampo (HPC), em azul ou córtex (CTX), em rosa

Figura 8.4: Diagrama de cordas representando a localização e o nível de expressão das proteínas envolvidas na via de Sistema Endocanabinoide (ANOVA ($p \leq 0.05$) após tratamento com clozapina. As cores das proteínas indicam seus níveis de expressão em $2\log(\text{Fold Change})$, enquanto as cordas destacam se foram encontradas alteradas no hipocampo (HPC), em azul ou córtex (CTX), em rosa.

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1: Lista dos genes marcadores do estado reativo de astrócitos. A tabela contém o símbolo do gene, nome, função global e referências de trabalhos que já reportaram a expressão destes em astrócitos reativos e no modelo da cuprizona. Referências não preenchidas representam o não retorno de trabalhos associados à expressão do gene no contexto de busca realizada na plataforma PubMed.

Tabela 2: Sequências de primers utilizadas para amplificação nas análises por RT-qPCR. Todos os primers foram padronizados com eficiência entre 90-110%.

LISTA DE ABREVIATURAS

ALDH1L1 - Aldeído desidrogenase 1

ALDOC/Aldoc - Aldolase c

CA3 - Cornus Ammon 3

CB1 - Receptores de canabinóides do tipo 1

CB2 - Receptores de canabinóides do tipo 2

CBD - Canabidiol

CLZ - Clozapina

CNO - N-óxido de clozapina

CPF - Córtex pré-frontal

CTL - Controle

CTX - Córtex

CUP - Cuprizona

CUP+CLZ - Co-tratamento cuprizona 0,2% + clozapina 10mg/kg

FAAH - Enzima hidrolase de amida de ácidos graxos

GFAP - Proteína ácida fibrilar glial

GLS - Glutaminase

GLUL/GS - Glutamina sintetase

HPC - Hipocampo

LCN2/Lcn2 - Lipocalina 2

LC-MS/MS - Cromatografia líquida-Espectrometria de massa em tandem

OPCs - Células precursoras de oligodendrócitos

RT-qPCR - Reação em cadeia da polimerase quantitativa com transcrição reversa

S100b - proteína ligadora de cálcio

SLC4A4 - Membro 4 da família 4 de transportadores de solutos

SNC - sistema nervoso central

SOD2 - Superóxido dismutase 2

SUMÁRIO

| | |
|------------------------------|-----|
| 1 Introdução | 22 |
| 2 Hipótese | 40 |
| 3 Justificativa | 41 |
| 4 Objetivos | 42 |
| 5 Métodos | 43 |
| 6 Resultados | 51 |
| 7 Discussão | 74 |
| 8 Conclusão | 90 |
| 9 Referências | 91 |
| 10 Anexos | 104 |

1 | INTRODUÇÃO

"Até agora, senhores, ao considerar o sistema nervoso, eu só falei das partes realmente nervosas dele. Mas se quisermos estudar o sistema nervoso, é extremamente importante ter conhecimento da substância que fica entre as próprias partes nervosas, que as mantém juntas e dá ao todo sua forma em maior ou menor grau" - **Citação de Rudolf Virchow, em uma palestra no Hospital Charitè, Berlim, 3 de abril de 1858.** (Kettenmann and Verkhratsky, 2008)

1.1 | Astrócitos

Por um longo período, os astrócitos estiveram às sombras na neurociência. Após um foco inicial nos neurônios, a pesquisa voltou sua atenção para as células produtoras de mielina do sistema nervoso central (SNC), os oligodendrócitos, e as células da imunidade inata, as microglias. No entanto, os astrócitos emergiram das sombras da neurociência e agora são reconhecidos como elementos-chave em uma ampla variedade de funções do SNC.

As células neurais podem ser categorizadas em neurônios e células gliais, sendo estas últimas subdivididas em macroglia e microglia. Enquanto a microglia desempenha o papel de células imunes inatas no SNC, a macroglia constitui uma população celular heterogênea, compreendendo oligodendrócitos, células endoteliais, pericitos e astrócitos (Kipp, 2023).

Os astrócitos são células que apresentam notável heterogeneidade em sua morfologia e função. Dentre os mais importantes tipos podemos citar: astrócitos protoplasmáticos, presentes na substância cinzenta; astrócitos fibrosos, presentes na substância branca; astrócitos velados, presentes na camada granular do córtex cerebelar ou bulbo olfatório; astrócitos perivascularares, que recobrem a superfície externa da membrana basal dos capilares cerebrais; astrócitos interlaminares, subconjunto de astrócitos corticais, que em humanos possuem longos processos interlaminares que se estendem entre as camadas 2 a 4 do córtex cerebral, mas em camundongos são interlaminares rudimentares, que residem na camada cortical 1 com processos curtos; e os astrócitos de projeção varicosa, estes últimos um tipo raro, caracterizados mais recentemente apenas no córtex de homínídeos e ainda em debate sobre ser, ou não, um tipo de astrócitos (Gomes, Tortelli and Diniz, 2013; Falcone *et al.*, 2019, 2022; Verkhratsky *et al.*, 2021; Degl'Innocenti and Dell'Anno, 2023).

Entre as características moleculares gerais dos astrócitos destacam-se a presença de prolongamentos com filamentos intermediários (fibrilas gliais), cujo componente principal é a proteína ácida fibrilar glial (GFAP); a proteína ligadora de cálcio, S-100 beta, a enzima conversora de glutamato em glutamina, glutamina sintetase e a enzima metabólica, aldeído

desidrogenase 1 (ALDH1L1), cujo padrão de especificidade têm se mostrado maior do que o clássico marcador GFAP (Cahoy *et al.*, 2008; Gomes, Tortelli and Diniz, 2013).

No que tange às funções, os astrócitos desempenham um papel fundamental na manutenção da homeostase do SNC e expressam uma infinidade de receptores, canais e transportadores de membrana (Verkhatsky and Nedergaard, 2018). No tocante aos processos sinápticos, os astrócitos estabelecem uma relação funcional complexa com neurônios compondo a sinapse tripartite, descrita por (Araque *et al.*, 1999) e atualmente sendo revisada e proposta como o novo conceito de ambiente ativo (“active milieu”) por (Semyanov and Verkhatsky, 2021) (Figura 1). Os processos perissinápticos astrogliais envolvem estreitamente os contatos sinápticos e controlam a homeostase da fenda sináptica, além disso, orquestram o ciclo glutamato/GABA-glutamina, fundamental para a neurotransmissão glutamatérgica e gabaérgica, sendo cruciais para o processamento, transmissão e armazenamento de informações no sistema nervoso, e conseqüentemente para os processos de plasticidade sináptica, aprendizado e memória (Perea, Navarrete and Araque, 2009; Verkhatsky and Nedergaard, 2016; Andersen, Schousboe and Verkhatsky, 2022). Ademais, por serem abundantemente equipados com diversos transportadores, estes processos astrogliais perissinápticos são responsáveis pela regulação iônica e neurotransmissora na fenda sináptica, apoiando o metabolismo local e liberando agentes necrófagos para combater espécies reativas de oxigênio (Verkhatsky, Nedergaard and Hertz, 2015)

Um papel adicional dos astrócitos é o apoio à homeostase metabólica, facilitando interações complexas entre a vasculatura sanguínea, o líquido cefalorraquidiano e o fluido intersticial circundante. Eles realizam essa função por meio de seus processos perivasculares, que compõem uma estrutura seletivamente permeável, formando uma barreira entre o tecido do sistema nervoso central e o líquido cefalorraquidiano nos espaços subaracnóides e ao longo de todo o sistema ventricular (Verkhatsky, Nedergaard and Hertz, 2015). Desta forma, contribuem para a integridade da barreira hematoencefálica e estabelecem um sistema de drenagem “glinfática” do SNC (Verkhatsky, Nedergaard and Hertz, 2015; Hablitz and Nedergaard, 2021).

Ademais, os astrócitos também se comunicam com oligodendrócitos e microglia através do contato direto entre as células, bem como por meio de citocinas, quimiocinas, exossomos e moléculas sinalizadoras secretadas (Matejuk and Ransohoff, 2020; Nutma *et al.*, 2020). Tal interação têm se mostrado importante para a modulação da resposta inflamatória no SNC e essencial para regulação da remielinização (Matejuk and Ransohoff, 2020; Nutma *et al.*, 2020; Molina-Gonzalez *et al.*, 2023).

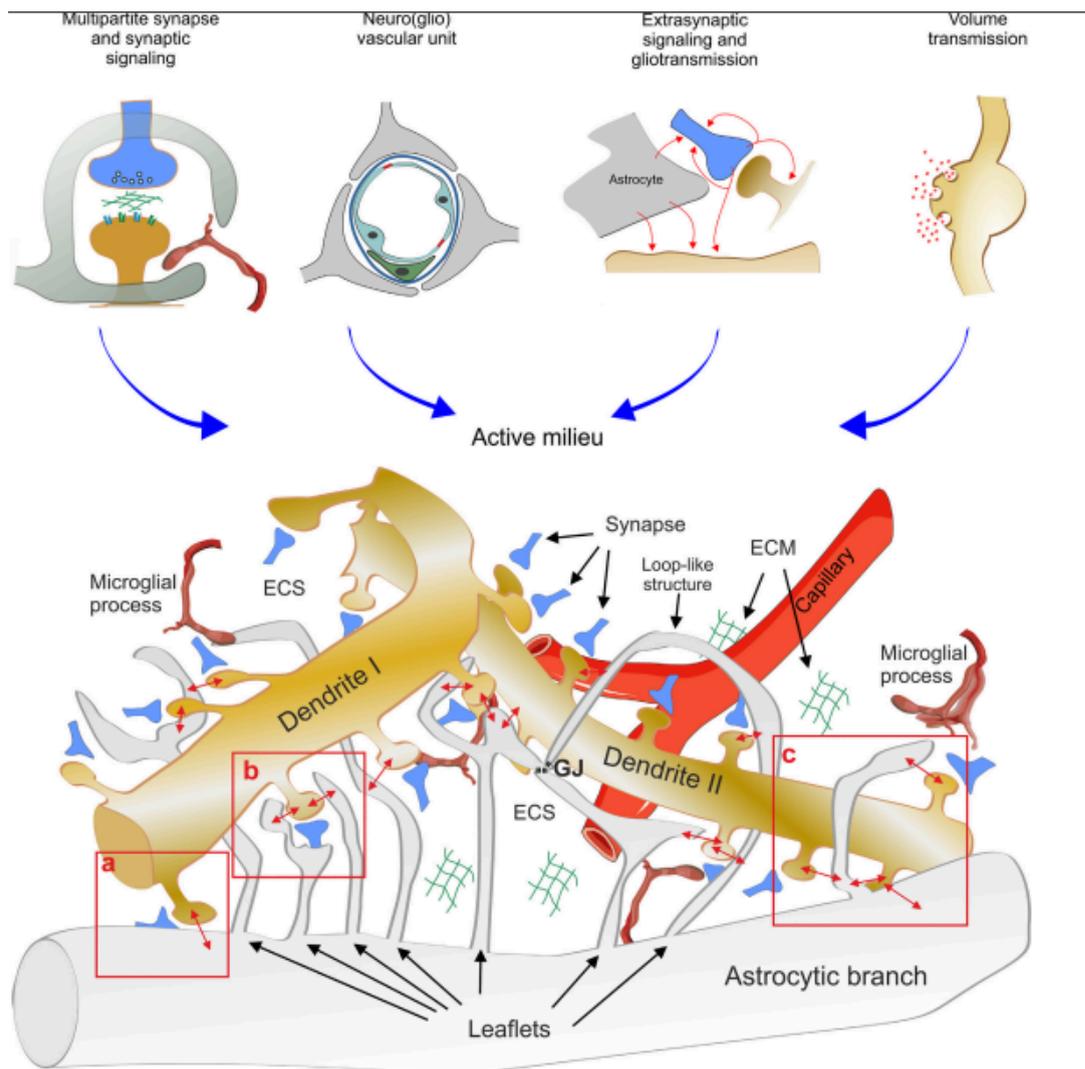


Figura 1: Comunicação astrócito-neuronal no ambiente ativo (“active milieu”). O conceito de ambiente ativo integra múltiplas teorias que abordam diferentes aspectos da organização funcional local do cérebro, como sinapse multipartida, unidade neuro(glio)vascular, sinalização extra sináptica e transmissão de volume. O ambiente ativo é formado por interações dinâmicas entre elementos neuronais (soma, axônios, dendritos e espinhas dendríticas), elementos celulares não neuronais (processos astrocíticos e microgliais), vasculatura (capilar), espaço extracelular (ECS) e matriz extracelular (ECM). Em um ambiente ativo, as sinapses podem se contatar, sinalizar e ser controladas homeosticamente por ramos astrocíticos (a), por uma ou várias “folhas” (b). Um único ramo ou folha astrocítica pode ser contatado por várias sinapses (c). Mudanças dinâmicas na morfologia dos processos astrocíticos afetam as barreiras de difusão, a depuração de neurotransmissores, a dinâmica de K^+ e o fornecimento de glutamina ou substratos energéticos, regulando assim a plasticidade neuronal. Os processos astrocíticos formam estruturas em forma de laço por meio de junções gap (GJs) recíprocas. Imagem retirada de (Semyanov and Verkhratsky, 2021).

Em suma, os astrócitos controlam a homeostase do SNC em todos os níveis de organização. Isso inclui a homeostase de íons, pH e neurotransmissores; fornecendo substratos metabólicos aos neurônios; apoiando os oligodendrócitos e axônios; regulando a sinaptogênese, neurogênese e formação e manutenção da barreira hematoencefálica; contribuindo para o funcionamento do sistema “glinfático”, participando da modulação da resposta inflamatória e regulando a homeostase sistêmica (Verkhratsky *et al.*, 2021). Além disso, os astrócitos são capazes de responder a estímulos patológicos que resultam no processo de reatividade astrocitária.

1.2 | Astrócitos e reatividade

As alterações patológicas nos astrócitos são documentadas em diversas doenças neurológicas e estes respondem a danos e doenças do SNC por meio de um processo denominado "reatividade" (Liddelow, Olsen and Sofroniew, 2024). A reatividade dos astrócitos é uma resposta defensiva complexa, heterogênea e específica ao contexto patológico, o que produz variados fenótipos reativos associados tanto a funções benéficas essenciais quanto a efeitos prejudiciais (Pekny, Wilhelmsson and Pekna, 2014; Verkhratsky, Nedergaard and Hertz, 2015; Liddelow, Olsen and Sofroniew, 2024).

É recente o estado da arte acerca da nomenclatura e definição da reatividade de astrócitos. Foi durante a década de 1970 que ocorreu a primeira descrição moderna de um ‘astrócito reativo’, após a descoberta da proteína ácida fibrilar (GFAP) de filamentos intermediários (Eng *et al.*, 1971). Atualmente, define-se ‘astrócitos reativos’ como astrócitos que passam por remodelação morfológica, molecular e funcional em resposta a lesão, doença ou infecção do SNC (Escartin *et al.*, 2021) (**Figura 1.1**).

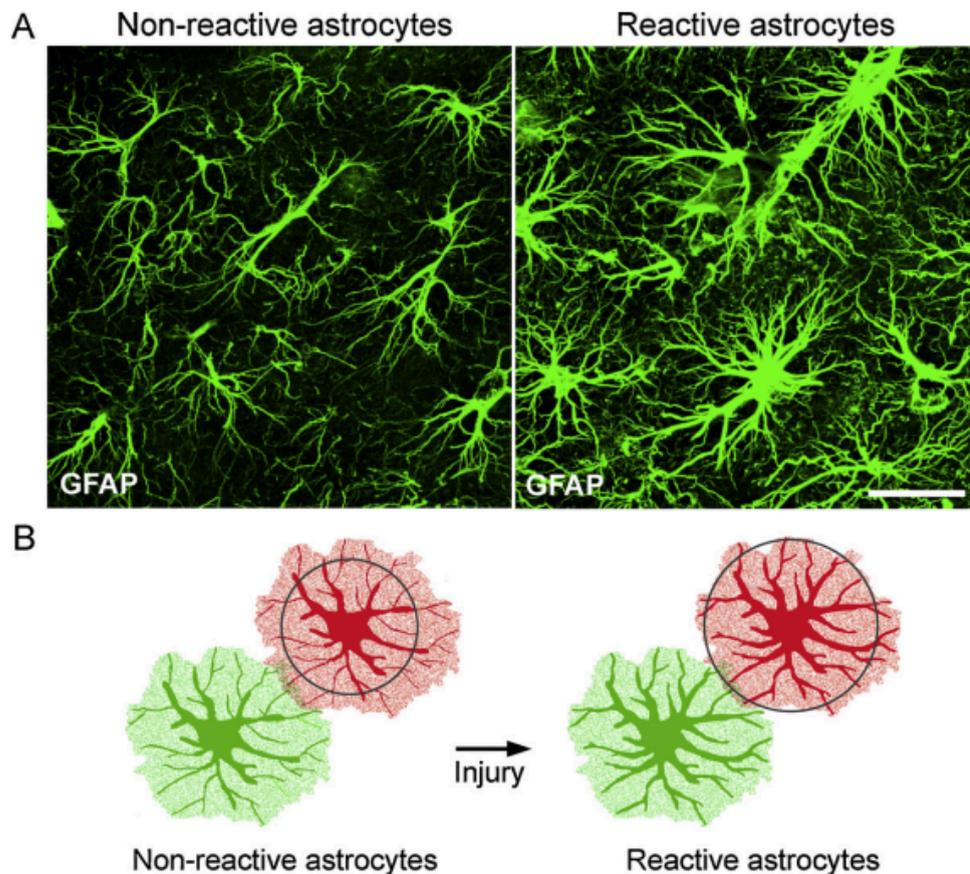


Figura 1.1: Detecção da reatividade astrocitária através da expressão da proteína do filamento intermediário GFAP. (A) Imunodetecção de GFAP (verde) em astrócitos não reativos no hipocampo de camundongo (à esquerda) e astrócitos reativos no hipocampo de camundongo 4 dias após a lesão do córtex entorrinal, estes últimos com claros sinais de hipertrofia dos processos astrocitários marcados com GFAP (à direita). (B) Esquema da resposta dos astrócitos à lesão. Os processos dos astrócitos reativos tornam-se mais espessos e, portanto, visíveis a uma distância maior quando visualizados com anticorpos contra GFAP. Em lesões pontuais do SNC, os astrócitos adjacentes à lesão podem se comportar de maneira diferente: eles também exibem hipertrofia dos processos, mas muitas vezes mostram uma extensão proeminente de seus processos celulares em direção à lesão, o que implica no rearranjo de seus domínios. Imagem retirada de (Pekny, Wilhelmsson and Pekna, 2014).

A nomenclatura é atualmente entendida em nível amplo como equivalente à ‘astroglíose reativa’, mas enfatiza como ‘astrócitos reativos’ a capacidade destas células de adotar estado(s) distintos em resposta a diversas patologias. Sendo ‘estado’ uma condição transitória ou duradoura dos astrócitos, caracterizada por um perfil molecular específico, funções específicas e impacto distinto em doenças (Escartin *et al.*, 2021). Portanto, tal terminologia inclui informações sobre a morfologia (por exemplo, hipertrofia, atrofia), marcadores moleculares e resultados funcionais, buscando identificar as principais variáveis

que impulsionam estados, fenótipos e funções de astrócitos reativos em contextos específicos (Escartin *et al.*, 2021).

Alguns dos aspectos benéficos da reatividade astrocitária vão desde o isolamento e contenção da região afetada do SNC do tecido vizinho, limitando o tamanho da lesão, até a regeneração tecidual, neuroproteção ativa e regulação da homeostase do SNC em momentos de estresse isquêmico agudo, osmótico ou outros tipos de estresse (Pekny, Wilhelmsson and Pekna, 2014; Linnerbauer and Rothhammer, 2020). Entretanto, os astrócitos também podem contribuir diretamente para os danos no SNC ao passarem por uma transformação reativa na qual perdem muitas de suas funções fisiológicas, como formação e maturação de sinapses, fagocitose, entre outras, e secretam citocinas e quimiocinas para aumentar a neuroinflamação e ácidos graxos de cadeia longa neurotóxicos, que matam as células vizinhas (Novakovic *et al.*, 2023; Liddelow, Olsen and Sofroniew, 2024).

A comunicação entre microglias e astrócitos desempenham um papel importante na resposta neuroinflamatória, contribuindo tanto para a destruição do tecido vizinho quanto para a resolução da inflamação. A literatura recente aponta que as microglias induzidas pela inflamação e pelo dano liberam fator de necrose tumoral (TNF), interleucina 1 α (IL-1 α), interleucina-1 β (IL-1 β) e componente 1q do complemento (C1q), que induzem os astrócitos a adquirirem um subestado de astrócitos reativos neurotóxicos (Matejuk and Ransohoff, 2020; Liddelow, Olsen and Sofroniew, 2024) (**Figura 1.2**). Além disso, os oligodendrócitos também secretam fatores conhecidos por ativar os astrócitos. Em situações de estresse, estas células liberam fatores como IL-1 β e IL-17, capazes de levar os astrócitos a um estado reativo que exacerba a inflamação no SNC (Nutma *et al.*, 2020).

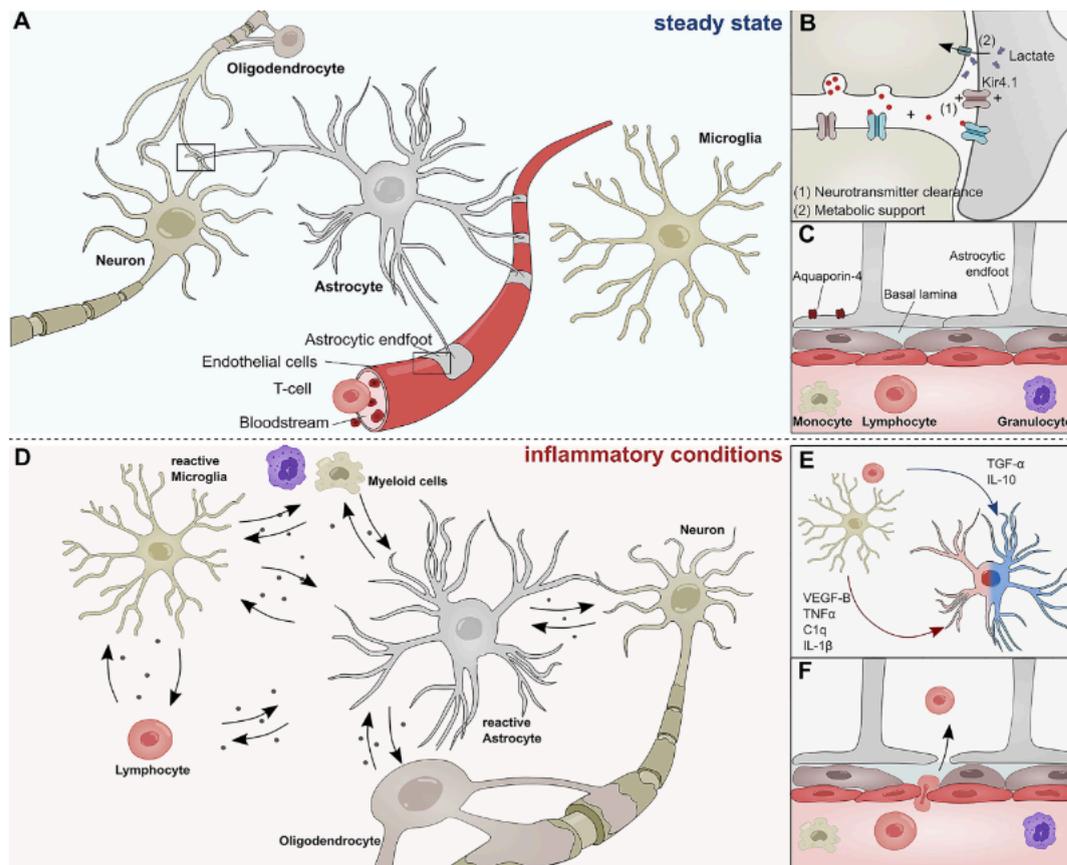


Figura 1.2: Astrócitos no estado não reativo, em condições normais e em estado reativo, em condições inflamatórias. (A) Os astrócitos interagem com neurônios, oligodendrócitos, microglia e células da barreira hematoencefálica (BHE) em condições normais. (B) Interações sinápticas (sinapses tripartites) dos astrócitos com neurônios regulando a transmissão sináptica através do suporte metabólico e da remoção de neurotransmissores. (C) As projeções dos astrócitos acompanham a vasculatura cerebral e são um constituinte da BHE, limitando assim a infiltração de patógenos e células imunes periféricas no SNC. Seus “pés” expressam aquaporina-4 e formam uma interação próxima com pericitos e a lâmina basal do parênquima cerebral. (D) Durante condições inflamatórias, astrócitos reativos secretam uma miríade de mediadores inflamatórios que regulam as funções de células mieloides, linfócitos, oligodendrócitos, neurônios e microglia. (E) Mediadores inflamatórios solúveis derivados de microglia e outras células imunes induzem diferencialmente funções patogênicas (vermelho) ou protetoras (azul) dos astrócitos. (F) Células imunes periféricas invadem a BHE durante condições inflamatórias e transgridem para o SNC. C1q, Componente 1q do complemento; IL-1 β , Interleucina-1 β ; IL-10, Interleucina 10; TNF- α , Fator de necrose tumoral α ; TGF- α , Fator de crescimento transformador α ; VEGF-B, Fator de crescimento endotelial vascular B. Imagem retirada de (Linnerbauer and Rothhammer, 2020)

Os sinais mais evidentes e amplamente reconhecidos da reatividade dos astrócitos incluem a hipertrofia dos processos celulares e o aumento na expressão de proteínas dos filamentos intermediários (nanofilamentos), especialmente a proteína GFAP, que é o

componente principal do sistema de filamentos intermediários dos astrócitos maduros (Pekny, Wilhelmsson and Pekna, 2014). Embora as alterações na quantidade de proteína GFAP e no nível de expressão do gene *Gfap* tenham sido marcadores úteis para avaliar a reatividade astrocitária até o momento, estudos recentes revelaram outros genes, que em conjunto, compõem um painel marcador do perfil reativo dos astrócitos (Liddelow et al. 2017; Labib et al. 2022; Escartin et al. 2021). Dentro deste painel de genes marcadores, cabe citar, além do *Gfap*, os genes *Aldoc*, *Chi3l1*, *Eaat1*, *Lcn2*, *S1rp3*, *S100b*, *Serpina3n*, *Srgn* e *Stat3* (**Tabela 1**) identificados como mais expressos em astrócitos reativos e também avaliados neste projeto (Liddelow et al., 2017; Escartin et al., 2021).

Com base nos argumentos expostos até aqui, é possível afirmar que o subestado reativo neurotóxico dos astrócitos compõe um elemento de grande atenção nas patologias do SNC, e portanto, um possível alvo para futuras intervenções terapêuticas.

| Gene | Nome | Função | Ref. Astrócitos | Ref. Cuprizona |
|------------------|--|---|---|--------------------------------------|
| <i>Aldoc</i> | Aldolase C | Enzima glicolítica | (Escartin <i>et al.</i> , 2021) | - |
| <i>Chi311</i> | Proteína leve do neurofilamento e quitinase 3 semelhante a 1 | Biomarcador para danos neuroaxonais agudos e inflamação local | (Cubas-Núñez <i>et al.</i> , 2021; Escartin <i>et al.</i> , 2021) | (Bonneh-Barkay <i>et al.</i> , 2010) |
| <i>Eaat1</i> | Transportador de aminoácidos excitatórios 1 | Controle da captação de glutamato e aspartato do espaço extracelular | (Beschoner <i>et al.</i> , 2007; Escartin <i>et al.</i> , 2021) | (Lee <i>et al.</i> , 2018) |
| <i>Gfap</i> | Proteína ácida fibrilar glial | Filamento intermediário | (Liddelow <i>et al.</i> , 2017; Escartin <i>et al.</i> , 2021) | (Zhan <i>et al.</i> , 2020) |
| <i>Lcn2</i> | Lipocalina-2 | Regulação de morte, sobrevivência celular, inflamação/transporte de ferro | (Liddelow <i>et al.</i> , 2017; Liu <i>et al.</i> , 2022) | (Liu <i>et al.</i> , 2022) |
| <i>Slpr3</i> | Receptores de esfingosina-1-fosfato 3 | Regulação da proliferação, motilidade, sobrevivência e rearranjo citoesquelético | (Liddelow <i>et al.</i> , 2017) | - |
| <i>S100b</i> | Proteína solúvel de ligação ao cálcio 100B | Regulação da proliferação, diferenciação, apoptose celular, inflamação/homeostase do Ca ²⁺ | (Escartin <i>et al.</i> , 2021) | (Liu <i>et al.</i> , 2022) |
| <i>Serpina3n</i> | Membro 3N do clado A de serpinas | Inibidor de serino-protease/resposta inflamatória | (Liddelow <i>et al.</i> , 2017; Escartin <i>et al.</i> , 2021) | - |
| <i>Srgn</i> | Serglicina | Proteoglicano mediador de reações inflamatórias | (Liddelow <i>et al.</i> , 2017) | - |

| | | | | |
|--------------|---|--|--|----------------------------|
| <i>Stat3</i> | Transdutor de Sinal e Ativador da Transcrição 3 | Transdução de sinais intracelulares induzidos por citocinas e fatores de crescimento | (Priego <i>et al.</i> , 2018; Escartin <i>et al.</i> , 2021) | (Ohgomori and Jinno, 2021) |
|--------------|---|--|--|----------------------------|

Tabela 1: Lista dos genes marcadores do estado reativo de astrócitos. A tabela contém o símbolo do gene, nome, função global e referências de trabalhos que já reportaram a expressão destes em astrócitos reativos e no modelo da cuprizona. Referências não preenchidas representam o não retorno de trabalhos associados à expressão do gene no contexto de busca realizada na plataforma PubMed.

1.3 | Princípios e mecanismo de ação da clozapina

A clozapina (CLZ) é uma dibenzodiazepina tricíclica (**Figura 1.3**) desenvolvida na década de 50 como uma potencial terapia farmacológica para o tratamento da esquizofrenia (Hippius, 1999). Foi classificada como antipsicótico atípico, por não produzir os efeitos colaterais que antipsicóticos clássicos ou típicos produzem (Seeman, 2002). Entretanto, na década de 70, o fármaco foi retirado do mercado após levar alguns pacientes a óbito devido ao efeito colateral de agranulocitose (Hippius, 1999). Devido a isso, seu uso ficou restrito a alguns países sob condições rigorosamente controladas até a década de 80, quando estudos demonstraram sua eficácia em uma proporção significativa de pacientes com esquizofrenia refratária (Hippius, 1999).

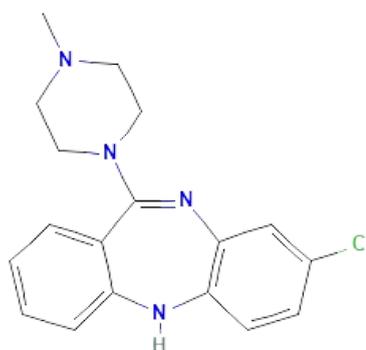


Figura 1.3: Estrutura química 2D da clozapina. Imagem retirada do site PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Clozapine#section=2D-Structure>).

Foi a partir da sua aprovação pelo *Food and Drug Administration* (FDA), na década de 90, que este fármaco foi reintroduzido na prática clínica de diversos países e demonstrado, em estudos comparativos com outros antipsicóticos, sua superioridade em tratar os sintomas positivos e negativos da psicose em pacientes resistentes ao tratamento (Pickar *et al.*, 1992; Lindenmayer, Grochowski and Mabusat, 1994; Hippius, 1999). Atualmente, a clozapina

possui duas indicações de uso aprovadas. A primeira, e principal, é para pacientes com esquizofrenia resistente ao tratamento, que tenham recebido doses adequadas de outros antipsicóticos (um ensaio de dois ou mais, com pelo menos um sendo um antipsicótico atípico de segunda geração) (Correll and Howes, 2021; Gammon *et al.*, 2021; Correll *et al.*, 2022). Enquanto que a segunda indicação é para reduzir o risco adicional de automutilação em pacientes com comportamento suicida recorrente diagnosticados com esquizofrenia ou transtorno esquizoafetivo (Food and Drug Administration Clozaril: Novartis Pharmaceuticals Corporation). Além disso, a clozapina é frequentemente utilizada, fora das indicações aprovadas, para tratar a doença de Parkinson, transtorno bipolar e esquizofrenia com depressão comórbida (Young *et al.*, 1997). Há também evidências preliminares sugerindo sua eficácia como terapia alternativa no transtorno depressivo maior (Tiihonen *et al.*, 2017).

Apesar de altamente eficaz, a clozapina continua sendo um medicamento subutilizado devido à necessidade de monitoramento laboratorial frequente, um regime de titulação regulamentado e um perfil de efeitos colaterais graves (Gammon *et al.*, 2021). Estes efeitos colaterais inclui riscos como agranulocitose, miocardite, convulsões, constipação, arritmia, síncope, hipersalivação, sintomas obsessivo-compulsivos (Khokhar *et al.*, 2018; de Leon *et al.*, 2020; Kim *et al.*, 2020) e síndrome metabólica, que engloba a desregulação da glicose, insulina, lipídios plasmáticos e gordura corporal (Yuen *et al.*, 2021).

O mecanismo preciso de ação antipsicótica da clozapina ainda não é completamente elucidado, porém é bem documentada sua interação com diversos neuroreceptores no SNC (Nasrallah, 2008; Wenthur and Lindsley, 2013). A clozapina atua como antagonista dos receptores de dopamina, porém possui baixa afinidade pelos receptores D2 (com menos de 60% de ocupação) e alta afinidade pelos receptores D4 (Seeman, 2014; Aringhieri *et al.*, 2018). Além disso, também possui afinidade alta por múltiplos receptores de serotonina (5-HT1A, 5-HT2A-C, 5-HT6, 5-HT7), receptores adrenérgicos alfa 1 (α_1) e alfa 2 (α_2), receptores de histamina (H1) e receptores muscarínicos M1-M5 (Wenthur and Lindsley, 2013; Aringhieri *et al.*, 2018; Stępnicki, Kondej and Kaczor, 2018). A dissociação rápida da clozapina dos receptores D2 (Kapur and Seeman, 2001) e sua atividade antagônica nos receptores 5-HT2A (Stępnicki, Kondej and Kaczor, 2018) foram apontadas como possíveis mecanismos subjacentes à sua eficácia antipsicótica, enquanto suas interações com diversos receptores como responsáveis por muitos dos seus efeitos adversos (Meltzer *et al.*, 2003; Gammon *et al.*, 2021).

A clozapina produz um metabólito principal, o N-desmetilclozapina (NMDC, norclozapina), que demonstra atividade semelhante à da clozapina nos receptores D2 e

5-HT_{2A}, além de também afetar outros receptores (Wenthur and Lindsley, 2013). Tanto a clozapina, quanto seu metabólito, têm a capacidade também de ativar os receptores de glutamato N-metil-D-aspartato (NMDA) (Wenthur and Lindsley, 2013). A metabolização da clozapina envolve diversas enzimas CYP, com destaque para a CYP3A4 e CYP1A2, responsáveis principalmente pela conversão em NMDC, enquanto a CYP1A2 é crucial na formação do N-óxido de clozapina (CNO) (Willcocks *et al.*, 2021). Embora haja sugestões de que o NMDC seja um metabólito ativo que contribui para o efeito terapêutico da clozapina, também pode estar associado à redução na contagem de neutrófilos em pacientes tratados com o fármaco (Willcocks *et al.*, 2021). O CNO, é considerado um metabólito inativo, porém parece ser mais neuroprotetor do que a clozapina em culturas de neurônios-glia expostas a agentes neurotóxicos como lipopolissacarídeo e 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), e esse efeito neuroprotetor parece ser resultado da inibição da neuroinflamação mediada pela microglia (Jiang *et al.*, 2016).

Também já foi documentado que a clozapina ativa a excitose de D-serina em astrócitos, que subsequentemente aumenta a liberação neuronal de L-glutamato via ativação do receptor NMDA no córtex pré-frontal e cultura primária de ratos (Tanahashi *et al.*, 2012). Além disso, a clozapina apresentou capacidade de reduzir a expressão de GFAP no corpo caloso de camundongos expostos à cuprizona (Chang *et al.*, 2019) e modular o proteoma de astrócitos em cultura expostos à MK-801, um antagonista do receptor NMDA (Martins-de-Souza, Lebar and Turck, 2011).

Apesar de haver indícios da interação e modulação de astrócitos pela clozapina, ainda são escassos os trabalhos que busquem compreender os efeitos deste fármaco na modulação do estado reativo destas células, e se esta modulação têm relação com o mecanismo de ação e efeitos clínicos deste fármaco.

1.4 | O modelo da cuprizona

Os distúrbios da mielina no SNC abrangem uma ampla gama de condições neurológicas em humanos, desde a esclerose múltipla (EM), uma patologia mais comum, até condições genéticas raras, como a doença de Niemann-Pick (Kipp, 2023). Além disso, há evidências de que disfunções dos oligodendrócitos e mielina estão relacionadas a diversos distúrbios neurodegenerativos e psiquiátricos, incluindo Alzheimer, Parkinson, transtornos alimentares, depressão e esquizofrenia (Gouvêa-Junqueira *et al.*, 2020; Kipp, 2023).

A cuprizona é um agente quelante que tem como alvo diversas metaloenzimas de cobre (Vega-Riquer *et al.*, 2019). Sua intoxicação resulta em desmielinização em todo o

cérebro e o modelo animal da cuprizona é bem estabelecido para mimetizar e estudar as alterações de mielina, além de processos de desmielinização e remielinização observados na esclerose múltipla (Vega-Riquer *et al.*, 2019). Alimentar os camundongos com 0,2% de cuprizona durante 5-6 semanas induz a ativação de microglia e macrófagos, a apoptose precoce nos oligodendrócitos e, finalmente, desmielinização (Blakemore, 1972; Buschmann *et al.*, 2012; Voss *et al.*, 2012; Zhan *et al.*, 2020).

Apesar de muitos estudos se concentrarem principalmente no corpo caloso, a desmielinização neste modelo afeta múltiplas áreas cerebrais, tanto de substância branca quanto cinzenta, como o córtex pré-frontal, córtex e hipocampo (Gudi *et al.*, 2009; Koutsoudaki *et al.*, 2009; Oveland *et al.*, 2021). Durante as 5-6 semanas de exposição à cuprizona, as regiões cerebrais passam por desmielinização aguda e quando a ingestão de cuprizona é interrompida, ocorre remielinização espontânea. No entanto, se a intoxicação pela cuprizona for prolongada além de 12-13 semanas, ocorre uma desmielinização crônica com capacidade limitada de remielinização espontânea (Zhan *et al.*, 2020; Kipp, 2023)

Mesmo não havendo um consenso sobre como a cuprizona induz toxicidade no metabolismo dos oligodendrócitos, diversas observações apontam para um modo de ação mais complexo que não se baseia apenas nas propriedades quelantes do cobre, mas também na capacidade da cuprizona de quelar outros metais, como zinco, ferro e manganês, prejudicando não só a função de diversas enzimas importantes como também diversos processos celulares (Gudi *et al.*, 2014; Taraboletti *et al.*, 2017)

A cuprizona parece afetar principalmente as mitocôndrias, resultando em aumento da produção de agentes oxidantes e distúrbios no metabolismo energético dos oligodendrócitos (Gudi *et al.*, 2014; Zirngibl *et al.*, 2022). Além disso, também induz a ferroptose e estresse no retículo endoplasmático, que juntamente com a redução nos níveis de aminoácidos, resulta em uma deficiência na síntese de lipídios da mielina e síntese de proteínas, eventualmente levando à desintegração da bainha de mielina (Praet *et al.*, 2014; Fischbach *et al.*, 2019; Jhelum *et al.*, 2020). Além disso, outros estudos indicam, que os efeitos prejudiciais da cuprizona não podem ser atribuídos apenas à quelação de cobre ou a um impacto seletivo nos oligodendrócitos. Em vez disso, propõe-se que o complexo reativo cuprizona-cobre e a indução de processos neuroinflamatórios, sejam responsáveis pelos efeitos tóxicos da cuprizona e que vários tipos de células no SNC sejam afetados (Pasquini *et al.*, 2007; Buschmann *et al.*, 2012; Gudi *et al.*, 2014; de los Angeles Castillo-Rodriguez *et al.*, 2022; Morgan *et al.*, 2022).

A reatividade dos astrócitos é um evento precoce e robusto durante a desmielinização induzida por cuprizona. Já na década de 1960, foi relatado que a ingestão de cuprizona por camundongos levou ao hipertrofia e hiperplasia de astrócitos em regiões do SNC que apresentavam sinais de desmielinização induzida por esta toxina, e que a reatividade astrocitária precedeu a perda de mielina (Carlton, 1967). Além disso, astrócitos reativos foram observados no modelo da cuprizona durante o processo de desmielinização aguda ou crônica, sendo que a reatividade astrocitária, marcada por proliferação precoce das células e aumento da expressão de GFAP no corpo caloso dos animais, persistiu mesmo após um período de recuperação de seis semanas (Hibbits *et al.*, 2012).

A reatividade proeminente dos astrócitos após exposição à cuprizona também já foi apontada tanto na substância branca, quanto cinzenta em outras regiões cerebrais para além do corpo caloso, como por exemplo, no hipocampo, cerebelo, córtex e gânglios da base (Gudi *et al.*, 2014). Ademais, a perda de astrócitos no modelo de cuprizona mostrou prejuízos no recrutamento de microglia e remoção dos resíduos da mielina danificada, trazendo como consequência danos na remielinização e na proliferação de células precursoras de oligodendrócitos (Skripuletz *et al.*, 2013; Gudi *et al.*, 2014; Sen *et al.*, 2022).

Diversos estudos já demonstraram que durante o curso da desmielinização induzida pela cuprizona, há uma regulação positiva significativa na expressão de proteínas marcadoras de astrócitos, como GFAP, ALDH1L1, vimentina (VIM), lipocalina 2 (LCN2) e S100B nas regiões desmielinizadas (Gudi *et al.*, 2014; de los Angeles Castillo-Rodriguez *et al.*, 2022; Kipp, 2023). De fato, vários estudos usando esse modelo conseguiram mostrar que os astrócitos estão funcionalmente envolvidos no processo de des- e remielinização, exercendo interações complexas entre células precursoras de oligodendrócitos, oligodendrócitos maduros e microglia .

1.5 | Regiões cerebrais

1.5.1 | Córtex

O córtex (CTX) dos mamíferos consiste em uma estrutura laminar localizada na parte externa do cérebro, que contém várias áreas e tipos celulares, os quais estão densamente interconectados de maneira complexa (Keller, Erö and Markram, 2018). É composto pela substância cinzenta contendo muitos corpos celulares neuronais e relativamente poucos axônios mielinizados (Keller, Erö and Markram, 2018; Javed, Reddy and Lui, 2019). Localizado logo abaixo das meninges, o córtex cerebral contém múltiplas camadas, cada uma

com diferentes densidades/tipos celulares e uma infinidade de funções (Keller, Erö and Markram, 2018; Javed, Reddy and Lui, 2019).

Em relação à densidade celular, de acordo com a revisão de literatura elaborada por (Keller, Erö and Markram, 2018), no CTX de camundongos a maioria das células excitatórias são células piramidais, e as células não neuronais superam em número os neurônios. Interneurônios inibitórios GABAérgicos compõem de 15 a 20% de todos os neurônios corticais. A densidade de células gliais diferem por região. A proporção de astrócitos para neurônios se mostrou mais alta no hipocampo do que no CTX, que por sua vez era maior do que no cerebelo (Keller, Erö and Markram, 2018). Entretanto, é importante citar que (Keller, Erö and Markram, 2018) chamam a atenção para o fato de que as densidades de neurônios e tipos celulares comuns estavam disponíveis na literatura para as regiões mais estudadas do cérebro. No entanto, a densidade de astrócitos e oligodendrócitos, em particular, não estava bem caracterizada fora das principais regiões cerebrais. Portanto, a escassez de dados na literatura ilustra que abordagens alternativas são necessárias para preencher tais lacunas.

A análise anatômica, bem como a localização de partes funcionalmente diferentes do córtex cerebral de roedores, é dificultada pelo fato de que a superfície do cérebro de espécies murinas é lisencefálica (**Figura 1.4**), diferentemente do CTX de primatas, principalmente humanos, que é composto de circunvoluções (giros) e fissuras (sulcos) (Schröder, Moser and Huggenberger, 2020). Ainda assim, o CTX dos camundongos é subdividido em regiões frontal, parietal, temporal, occipital, cingulada, insular e pallium lateral, sendo cada uma dessas subdivididas em demais regiões de acordo com suas especificidades (Schröder, Moser and Huggenberger, 2020).

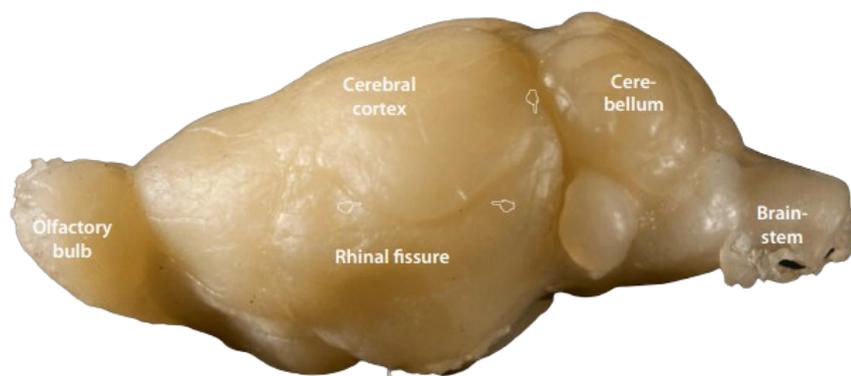


Figura 1.4: Visão lateral do cérebro do camundongo (C57BL/6). O córtex cerebral de roedores possui superfície lisencefálica. Imagem retirada de (Schröder, Moser and Huggenberger, 2020).

1.5.2 | *Córtex pré-frontal*

O córtex pré-frontal (CPF) é fundamental para uma variedade de funções executivas, incluindo motivação, atenção, tomada de decisão, controle inibitório, cognição social e memória (Bicks *et al.*, 2015; Hui and Beier, 2022). Na neurociência translacional, existe certa controvérsia sobre a existência do CPF em roedores, e muitos pesquisadores têm discutido a semelhança entre regiões específicas no cérebro anterior destes e de primatas (Bicks *et al.*, 2015; Hui and Beier, 2022).

Em humanos, há um consenso de que o CPF pode ser dividido nas regiões dorsolateral (dlCPF), ventrolateral (vlCPF), dorsomedial (dmCPF), ventromedial (vmCPF), córtex cingulado anterior (ACC) e orbitofrontal (OFC) (Hui and Beier, 2022). Já em camundongos, a literatura descreve que o CPF é uma subregião do CTX frontal e compreende o córtex infra-límbico (IL), córtex orbital medial (MO), córtex pré-límbico (PrL), córtex orbital ventral (VO), córtex orbital dorsolateral (DLO) e córtex orbital lateral (LO) (**Figura 1.5**) (Schröder, Moser and Huggenberger, 2020)

Apesar de tal controvérsia, pesquisas em humanos e animais têm indicado um papel central das regiões frontais do cérebro na cognição, e alterações nessa região têm sido associadas a prejuízos na atenção, memória de trabalho e tomada de decisão, que são funções cognitivas comuns atribuídas ao CPF (Carlén, 2017). Em roedores, por exemplo, déficits nas sinalizações do CPF foram associados a um desempenho prejudicado na aquisição e consolidação da memória (Hui and Beier, 2022). Além disso, a ablação genética dos receptores gabaérgicos GABA_B nos astrócitos do mCPF de camundongos alterou as oscilações de baixa frequência gama e as propriedades de disparo dos neurônios corticais, o que afetou os comportamentos direcionados a objetivos e memória de trabalho dos mesmos (Mederos *et al.*, 2020). A perda astrocítica induzida pela toxina L α -aminoadipato no mCPF de ratos também afetou o ajuste atencional, a memória de trabalho e as funções de aprendizagem dos animais (Lima *et al.*, 2014).

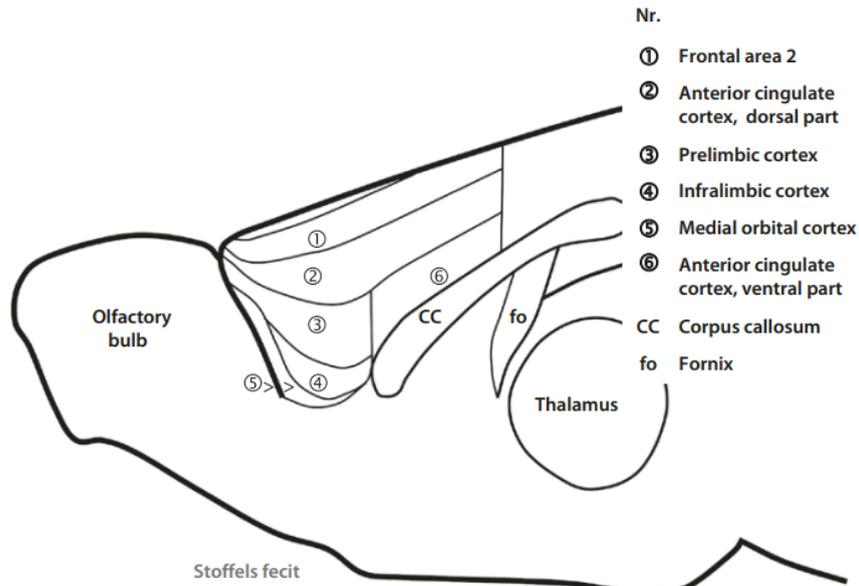


Figura 1.5: Representação esquemática do córtex pré-frontal de camundongos em vista mediosagital. Na direção dorsoventral, as áreas frontais 2, córtex cingulado anterior (parte dorsal), pré-límbico, infra-límbico e córtex orbital medial estão dispostas. Posterior ao córtex pré-límbico, encontra-se o córtex cingulado anterior (parte ventral). Imagem retirada de (Schröder, Moser and Huggenberger, 2020).

1.5.3 | *Hipocampo*

O hipocampo (HPC) é uma região localizada no lobo temporal medial de cada hemisfério cerebral e de grande interesse devido seu papel central na aprendizagem e na formação e armazenamento de memórias (Schultz and Engelhardt, 2014). Esta região faz parte de uma estrutura maior denominada formação hipocampal, que inclui o hipocampo, o giro denteado (GD) e o giro parahipocampal, sendo este último composto pelo córtex entorrinal e o subiculum (Schultz and Engelhardt, 2014). De acordo com estudos moleculares e anatômicos, pode se subdividir a região do hipocampo em três setores: CA1, CA2 e CA3 (**Figura 1.6**), compostos principalmente por neurônios piramidais e astrócitos, que desempenham um papel fundamental na regulação da plasticidade sináptica no hipocampo (Schultz and Engelhardt, 2014; Wang, Fu and Ip, 2022).

A capacidade de aprender e lembrar localizações espaciais e de associá-las a outros estímulos é um comportamento adaptativo essencial para a sobrevivência. Ambas, navegação e memória espacial estão associadas principalmente ao hipocampo, tanto em roedores quanto em humanos (Bannerman *et al.*, 2014). Ademais, o hipocampo é uma região envolvida em

diversos distúrbios neurológicos e psiquiátricos, como depressão, esquizofrenia, doença de Alzheimer, esclerose múltipla e epilepsia (Anand and Dhikav, 2012).

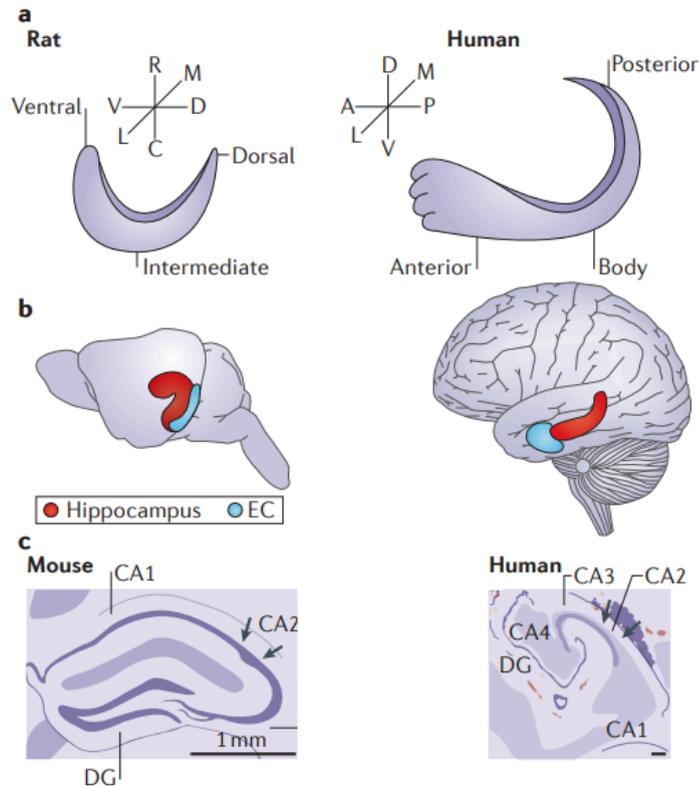


Figura 1.6: Anatomia comparada do hipocampo de roedores e humanos. A) Diferença da disposição entre roedores (dorsal-ventral) e humanos (anterior-posterior). B) Posição do hipocampo e do córtex entorrinal (EC) no cérebro de roedores e humanos. C) Esquema das seções transversais de tecido corado pela técnica de Nissl em hipocampo de roedores e humanos. Adaptado de (Strange *et al.*, 2014).

2| HIPÓTESE

Dado que a reatividade astrocitária é uma característica presente em diversas condições patológicas do SNC e no modelo da cuprizona (Gudi *et al.*, 2009; Zhan *et al.*, 2020; Kipp, 2023; Liddelow, Olsen and Sofroniew, 2024), conjuntamente com indícios de que o antipsicótico clozapina seria capaz de modular o perfil reativo dos astrócitos (Chang *et al.*, 2019), esperamos que a expressão dos marcadores específicos de reatividade dos astrócitos esteja aumentada após a exposição à cuprizona e que o tratamento com clozapina reverta esta expressão, indicando a modulação da reatividade astrocitária como um dos mecanismos de ação deste fármaco. Além disso, esperamos compreender melhor as proteínas e vias bioquímicas envolvidas no modelo cuprizona e tratamento com clozapina através da análise proteômica.

3| JUSTIFICATIVA

Nosso grupo de pesquisa tem buscado compreender o mecanismo de ação de antipsicóticos, bem como as bases moleculares da esquizofrenia e as alterações gliais dentro do contexto deste transtorno. Considerando que o estado reativo neurotóxico dos astrócitos contribui para os processos de inflamação e desmielinização do sistema nervoso central, e que apesar de mais de 30 anos de intenso estudo, as bases moleculares precisas que explicam a eficácia única da clozapina permanecem indefinidas, o presente estudo busca acessar o perfil de reatividade de astrócitos através do modelo desmielinizante e neuroinflamatório da cuprizona, bem como investigar se a modulação da reatividade astrocitária no córtex pré-frontal, córtex e hipocampo de camundongos compõe o mecanismo de ação da clozapina. Também buscamos fornecer *insights* sobre proteínas diferencialmente expressas e vias bioquímicas moduladas no córtex e hipocampo dos animais, bem como interpretar possíveis características funcionais associadas a tais padrões de expressão e sua relação com o mecanismo de ação deste fármaco. Ademais, a reatividade de astrócitos no contexto da esquizofrenia tem sido reportada tanto em relação à fisiopatologia, quanto ao tratamento deste transtorno (Catts *et al.*, 2014; Gomes *et al.*, 2015; Mallya and Deutch, 2018; Chang *et al.*, 2019; Carmona *et al.*, 2023). Sendo assim, os dados produzidos nesta dissertação podem servir de base não só para uma maior compreensão do mecanismo de ação da clozapina, mas também para futuros estudos no contexto da esquizofrenia.

4 | OBJETIVOS

No decorrer deste projeto os seguintes objetivos específicos foram perseguidos:

- Analisar os efeitos da clozapina no modelo da cuprizona *in vivo* através de testes comportamentais;
- Avaliar o perfil de reatividade dos astrócitos nas regiões córtex, córtex pré-frontal e hipocampo de camundongos expostos à cuprizona e após tratamento com clozapina, através da análise de expressão gênica (RT-qPCR) de um painel marcador da reatividade astrocitária;
- Avaliar se a cuprizona e clozapina altera a expressão de GFAP no hipocampo dos camundongos através da análise por imunofluorescência;
- Avaliar as alterações proteômicas nas regiões córtex e hipocampo dos camundongos expostos à cuprizona e após tratamento com clozapina, buscando identificar proteínas e vias bioquímicas relacionadas ao mecanismo de ação da clozapina.

5 | MÉTODOS

5.1 | Animais

Os camundongos C57BL/6 machos com 8 semanas de idade foram obtidos no CEMIB, Unicamp. Todos os animais foram mantidos em gaiolas de polietileno apropriadas para camundongos e acomodadas em estantes ventiladas com temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e umidade ($55\% \pm 5$) controladas e sistema de fotoperíodo determinado de 12 horas de claro/escuro com acesso à água e à ração ad libitum. Todos os procedimentos realizados foram aprovados pela Comissão de Ética de Uso de Animais (CEUA), protocolo CEUA 5448-1/2019.

5.2 | Drogas e tratamento dos animais

A Cuprizona (Sigma-Aldrich) foi misturada à ração em pó em uma concentração final de 0,2%. A clozapina (Supera Farma Laboratórios S.A.) foi solubilizada em dimetilsulfóxido (DMSO), diluída em solução salina estéril e administrada via i.p. na concentração de 10mg/kg.

A partir da 3ª semana de exposição à cuprizona 0.2% ou dieta normal os animais foram separados em 4 grupos experimentais e tratados via i.p. por 2 semanas: controle (CTL) - solução Veículo (Salina (NaCl 0,9%) : DMSO : Tween, na proporção 8:1:1); Clozapina (CLZ) 10mg/kg; Cuprizona (CUP) + Veículo; CUP_CLZ - 5 semanas de exposição à cuprizona 0,2%, mais 2 semanas de tratamento com clozapina (10mg/kg) a partir da 3ª semana de exposição à cuprizona (**Figura 2**). Os animais foram submetidos aos testes comportamentais descritos na próxima sessão após a 3ª semana de exposição à CUP, para validação do modelo e ao término da 5ª semana de cada tratamento, para avaliar os efeitos do tratamento com CLZ no modelo. Os testes e dados dos experimentos campo aberto, memória e reconhecimento de objetos e de interação social, bem como a coleta das regiões cerebrais, foram realizados pela Drª. Fernanda Crunfli.

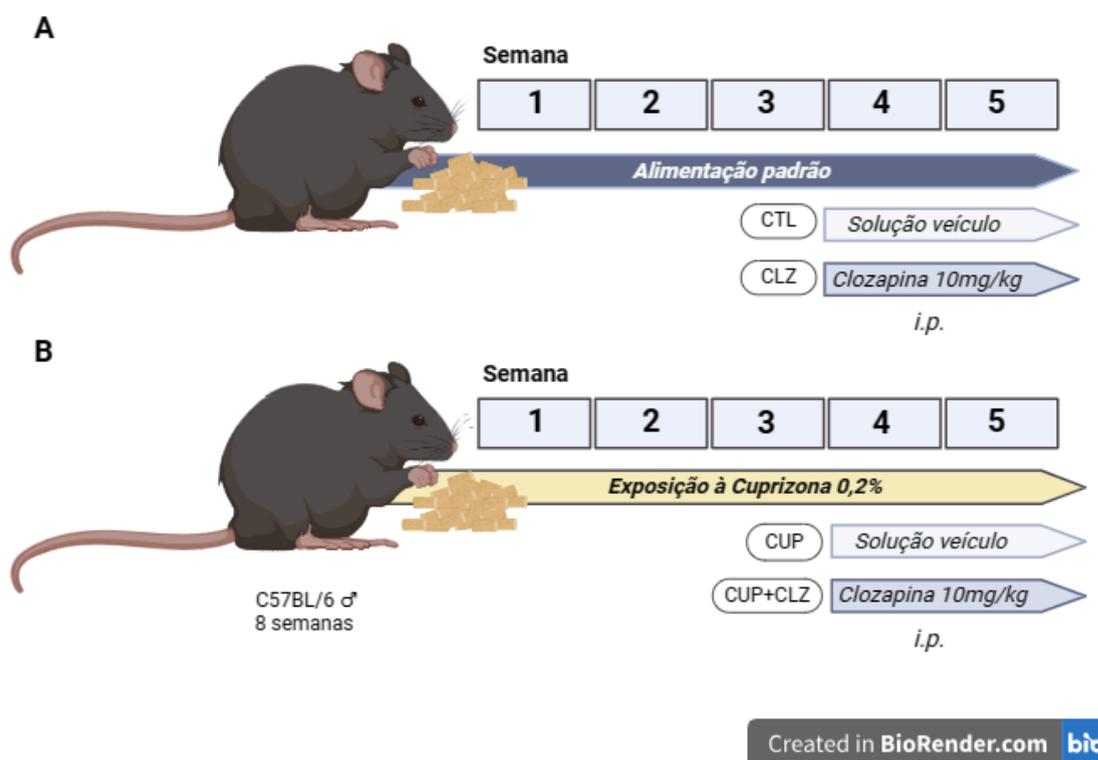


Figura 2: Imagem ilustrativa representando os 4 grupos experimentais. (A) Os camundongos C57BL/6 do grupo Controle (CTL) e Clozapina (CLZ) receberam alimentação padrão (ração moída) por 5 semanas e aplicação i.p. da solução veículo no grupo CTL e clozapina (10mg/kg) no grupo CLZ, por 2 semanas a partir da 3ª semana de alimentação padrão. (B) Os camundongos C57BL/6 do grupo Cuprizona (CUP) e Cuprizona+Clozapina (CUP+CLZ) receberam ração moída misturada com cuprizona em uma concentração final de 0,2% por 5 semanas e aplicação i.p. da solução veículo no grupo CUP e clozapina (10mg/kg) no grupo CUP+CLZ, por 2 semanas a partir da 3ª semana de exposição à cuprizona.

5.3 | Testes comportamentais

5.3.1 | Avaliação da Locomoção: Campo Aberto

Os camundongos foram colocados em uma arena medindo 30 x 30cm, com o assoalho dividido em 12 quadrantes iguais onde permaneceram por 15 minutos, os quais puderam explorar a arena livremente, em sala isolada e iluminada com lâmpada incandescente (60 lx no nível do chão da arena). As sessões foram registradas em vídeo através de uma câmera Sony Action Cam 4K que, por sua vez, foram utilizadas para a análise empregando-se o programa computacional ANY-maze. Após cada sessão, o campo aberto foi limpo com

solução de água e etanol a 10%. Os experimentos foram realizados no período entre 7:00-14:00 horas.

5.3.2 | Avaliação cognitiva: Memória de Reconhecimento de Objetos

Com o intuito de reduzir o estresse associado a um novo ambiente e minimizar o efeito de comportamentos exploratórios naturais que podem interferir no teste, os camundongos foram primeiro habituados ao ambiente experimental que consistiu na arena do campo aberto por um total de 15 minutos. Após 24h do processo de habituação, os camundongos passaram pela fase de familiarização, onde foram colocados na arena com dois objetos idênticos (objetos A), em forma e volume, por um total de 10 minutos. Após 1 hora de exposição aos objetos idênticos, a memória de curta duração (*short-term*) foi avaliada apresentando um dos objetos da fase de familiarização (objeto A), mais um objeto novo de forma diferente (objeto B), por 5 minutos. Após 24h a memória de longa duração (*long-term*) foi avaliada apresentando novamente um dos objetos familiares (objetos A) e um novo objeto, de forma diferente (objeto C), por 5 minutos. Entre cada animal testado, a arena e os objetos foram higienizados utilizando álcool a 10%, a fim de remover qualquer indício de odores que pudessem influenciar os resultados. Foi utilizado como parâmetro de análise a duração da interação com os objetos ao longo de um período de 5 minutos. Isso incluiu atividades como cheirar, lambe, tocar com o focinho ou as patas dianteiras, além de quando o animal aproximava o focinho do objeto a uma distância de até 1 cm (Leger *et al.*, 2013). O índice de reconhecimento foi avaliado através da mensuração do tempo gasto na exploração do objeto B ou C, dividido pelo tempo total de exploração dos objetos (A+B ou A+C). Todas as sessões foram registradas em vídeo através de uma câmera Sony Action Cam 4K.

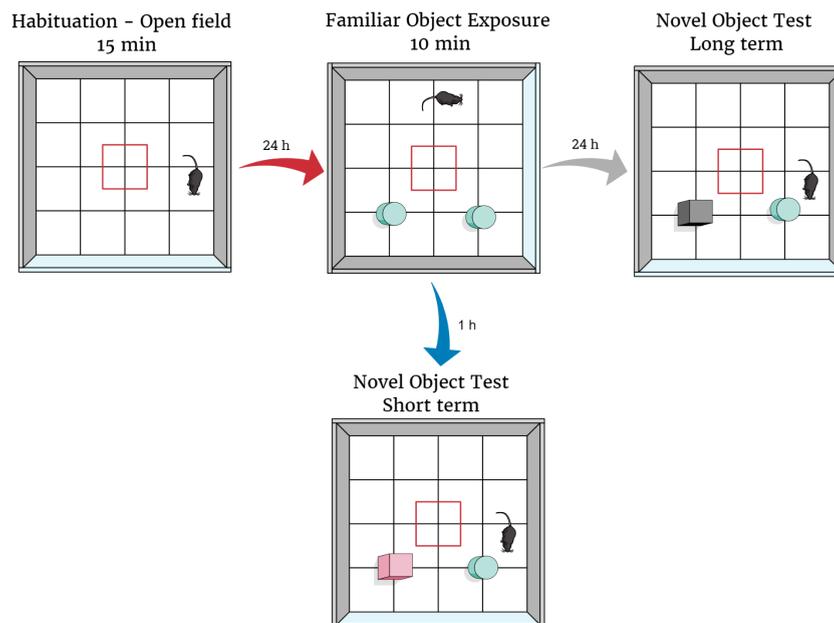


Figura 2.1 - Protocolo experimental para o teste comportamental de reconhecimento de objetos após a exposição a cuprizona e tratamento com clozapina (10 mg/kg, i.p.). Após 3 e 5 semanas de exposição à cuprizona 0,2% e posteriormente 2 semanas de tratamento com clozapina (10 mg/kg, i.p.) os animais passaram pela sessão de habituação à arena de campo aberto por 15 minutos. Após 24h os animais foram expostos a 2 objetos de forma e volume idênticos (A e B), por 10 minutos. Após 1 hora dessa exposição, a memória de curta duração (*Short-term*) foi avaliada pela apresentação de um dos objetos do treino (A) e um novo objeto, de forma diferente (B). Após 24 horas foi avaliada a memória de longa duração (*Long-term*) pela apresentação de um dos objetos do treino (A) e outro novo objeto, de forma diferente (C). Após 24 horas do último teste, os animais foram eutanasiados e as regiões cerebrais coletadas para análise gênica por RT-qPCR e proteína por imunofluorescência e proteômica.

5.3.3 | Teste de interação social

Os camundongos foram habituados à arena do campo aberto, conforme descrito previamente (Gomes *et al.*, 2015; Rodrigues da Silva *et al.*, 2020). Após a habituação, o camundongo a ser avaliado (camundongo-teste), juntamente com um camundongo desconhecido (não-familiar) de mesma idade, foram colocados em lados opostos da arena do campo aberto (30 x 30 cm), onde podiam explorar livremente por 10 minutos. O comportamento social ativo foi medido pelo tempo em que os camundongos-teste passavam interagindo com o camundongo não-familiar, através de comportamentos como farejar, seguir, acariciar e subir ou se esconder sob o camundongo não-familiar.

5.4 | Coleta dos Tecidos para RT-qPCR, proteômica e imunofluorescência

Para a coleta das regiões CPF, CTX e HPC, ao término da 5ª semana de cada tratamento, os animais foram anestesiados com xilazina 20 mg/kg e quetamina 100 mg/kg, via i.p. conforme descrito em (Levin-Arama *et al.*, 2016). Constatada a anestesia profunda pela perda de reflexo corneal, os animais foram submetidos à perfusão transcardíaca, com solução salina 0,9%, e os encéfalos foram coletados, as regiões foram separadas (**Figura 2.1**), congeladas imediatamente a -55°C e estocadas a -80°C .

Para a coleta dos encéfalos destinados a imunofluorescência, os animais foram anestesiados e submetidos à perfusão transcardíaca, com solução salina 0,9%, seguida de solução fixadora constituída de paraformaldeído 4% dissolvido em tampão fosfato 0,1 M (PB, pH 7,4). Após a perfusão, os encéfalos foram coletados e armazenados em paraformaldeído 4% por 24 horas. Após este período, o material foi transferido para uma solução crioprotetora de sacarose a 30% em PB 0,01M. Após 4 dias, os cérebros foram secos em papel toalha e congelados em isopentano por 60 segundos e armazenados no biofreezer a -80°C .

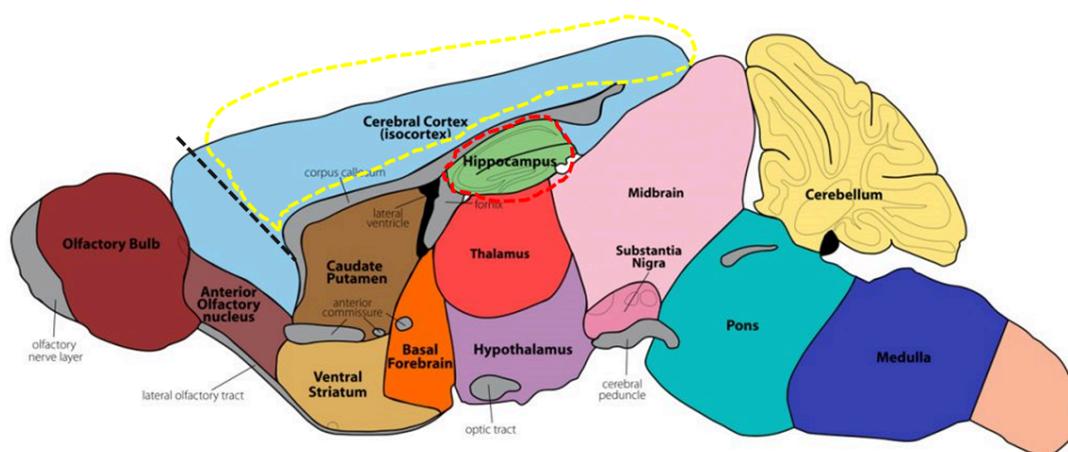


Figura 2.2: Esquema com vista lateral do cérebro do camundongo C57BL/6 ilustrando as regiões coletadas para análise de RT-qPCR e proteômica. As linhas tracejadas delimitam as regiões coletadas na matriz de corte: em preto, córtex pré-frontal (CPF); amarelo, córtex (CTX); vermelho, hipocampo (HPC).

5.5 | Imunofluorescência

Os cérebros previamente coletados foram processados em um criostato (Leica® Biosystems - Wetzlar, Germany) a uma temperatura de -20°C (± 1) sendo produzidos cortes histológicos de $30\mu\text{m}$ para cada animal. O início da coleta dos cortes foi a partir da visualização do terceiro ventrículo, e o final da coleta após o desaparecimento da camada de

células granulares do GD (Bregman -1.72mm AP até -6.72mm AP). A região mencionada foi identificada de acordo com as coordenadas do atlas cerebral de camundongos *Paxinos and Franklin's the Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. Os cortes histológicos foram coletados em placas de cultivo, em solução tampão (PBS 0,1 M com 0,05% azida), e estocados em geladeira a 4 °C.

Para o ensaio de imunofluorescência os cortes de hipocampo dorsal foram lavados em PBS 0,1 M por duas vezes de 10 minutos, e foram então incubados em solução bloqueio (PBS 0,1 M contendo 0,2% Triton X-100 e 3% BSA) por 30 minutos. Após este período, os cortes foram incubados com anticorpo primário anti-GFAP (1:500, Abcam), em solução de bloqueio por um período de 14 a 18 horas à 4°C. Em seguida, os cortes foram lavados 3x de 10 minutos com PBS 0,1 M à temperatura ambiente e incubados por 1 hora com anticorpo secundário em uma concentração de 1:500 em solução de bloqueio. Após 3 lavagens de 10 minutos com PBS 0,1 M com o objetivo de remoção do excesso de reagente, os cortes foram colocados sobre lâminas de vidro gelatinizadas e cobertos com lamínulas, tendo como meio de montagem o Permount (Sigma). Os limites da região CA3 foram localizados baseando-se em estudos anteriores sobre as regiões (Richards *et al.*, 2011), e marcadores encontrados nas imagens de hibridização *in situ* do Allen Brain Atlas (<http://portal.brain-map.org/>).

5.6 | Extração de RNA e RT-qPCR

A extração do RNA total dos tecidos foi realizada com o uso do reagente Trizol de acordo com as instruções do fabricante (Invitrogen, Califórnia, EUA). A concentração e pureza de cada amostra foram verificadas no espectrofotômetro DeNovix. Para a produção do cDNA, a transcrição reversa foi realizada com 500 ng de RNA utilizando o kit Promega. Em cada reação de qPCR de 10 µL, 1 µL de cDNA diluído em 1:10 foi misturado com 200 nM dos primers (Exxtend, Campinas, São Paulo, BRA), 5 µL do master mix Evagreen (Cellco) e água sem nucleases. A expressão dos mRNAs foi analisada por meio da PCR em tempo real quantitativa. As reações foram realizadas no sistema CFX 384 Touch Real-Time PCR Detection System (Biorad). As curvas de dissociação dos produtos da PCR foram obtidas com um aquecimento inicial de 50°C por 2 minutos e 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Para avaliar a especificidade dos primers, as amostras foram aquecidas de 65°C a 99°C. Os dados foram normalizados pela expressão dos genes housekeeping Actb (β -actina; 100 nM) e Hprt (Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyltransferase; 200nM). A quantificação relativa de cada gene alvo foi analisada utilizando o método de CT comparativo (Vandesompele *et al.*, 2002; Schmittgen and Livak,

2008). Para a amplificação, foi realizada a padronização dos primers, onde primers com eficiência entre 90-110% foram utilizados. As seqüências dos primers utilizados estão descritas na **Tabela 2**.

| Gene | Foward | Reverse | Ref. |
|------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------------|
| <i>Aldoc</i> | GAGGTATCTGTCACGCCCC | CTCGGTCCAAGCTGGAGTAA | www.ncbi.nlm.nih.gov |
| <i>Chi3l1</i> | CACACCTCTACTGAAGCCAGG | GCAGACCAGCTTGTACGCAG | www.ncbi.nlm.nih.gov |
| <i>Eaat1</i> | GGCAGCTCCCAGGTTTAAAAG | GAAGCAGCTGGTACTGTCAGA | www.ncbi.nlm.nih.gov |
| <i>Gfap</i> | GCCACCAGTAACATGCAAGA | GGCGATAGTCGTTAGCTTCG | (Zhang <i>et al.</i> , 2020) |
| <i>Lcn2</i> | CCAGTTCGCCATGGTATTTT | CACACTCACCACCCATTTCAG | www.ncbi.nlm.nih.gov |
| <i>S1pr3</i> | AAGCCTAGCGGGAGAGAAAC | TCAGGGAACAATTGGGAGAG | www.ncbi.nlm.nih.gov |
| <i>S100b</i> | CACCCGAAGAGGTTGCTCAT | GGAAGGGTGTAGGCGATCAG | www.ncbi.nlm.nih.gov |
| <i>Serpina3n</i> | CCTGGAGGATGTCCTTTCAA | TTATCAGGAAAGGCCGATTG | www.ncbi.nlm.nih.gov |
| <i>Srgn</i> | GCAAGGTTATCCTGCTCGGA | TGGGAGGGCCGATGTTATTG | www.ncbi.nlm.nih.gov |
| <i>Stat3</i> | ACCATTGACCTGCCGATGTC | TCCATGTCAAACGTGAGCGA | www.ncbi.nlm.nih.gov |

Tabela 2: Sequências de primers utilizadas para amplificação nas análises por RT-qPCR. Todas as seqüências referenciadas como <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> foram desenhadas na plataforma *National Center for Biotechnology Information*. Todos os primers foram padronizados com eficiência entre 90-110%.

5.7 | Análise proteômica

Após o final dos tratamentos, os encéfalos foram extraídos pela Dr^a Fernanda Crunfli e para as análises proteômicas as seguintes regiões cerebrais foram coletadas: córtex (N CTL= 5; N CUP = 4; N CLZ = 3; CUP+CLZ = 4) e hipocampo (N CTL = 4; N CUP = 4; N CLZ = 4; N CUP+CLZ = 4). Os tecidos foram homogeneizados em tampão de lise (Tris-HCL 100mM, 1mM EDTA, 150 mM NaCl, 0,5% Triton-X e cocktail de inibidores de protease) e mecanicamente lisados através de maceração com pistilo e ultrasonicador de ponta. O extrato de proteínas totais foi quantificado por BCA conforme as instruções do fabricante (Thermo Scientific). 30 µg do extrato de proteínas de cada amostra foi transferido para um Microcon-10 Centrifugal Filter, com corte de 10 kDa, para digestão por FASP (Sielaff *et al.*, 2017; Carregari, 2022). Após a digestão por tripsina, os peptídeos foram secos e re-suspendidos em 0,1% FA, sendo subsequentemente submetido à análise por LC-MS/MS. Realizamos análise de LC-MS de quantificação livre de marcação (label-free) e aquisição independente de dados (DIA) com incremento de mobilidade iônica (HDMse, Waters Co),

utilizando duplicatas técnicas para cada uma das replicatas biológicas. Os dados brutos advindos das análises de LC-MS foram importados no programa Progenesis QI for proteomics (Waters, Co), para realizarmos a normalização, identificação e quantificação das proteínas. Proteínas com ANOVA (p) \leq 0.05 entre os grupos foram quantificadas e consideradas para a análise de expressão diferencial.

5.8 | Análise *in silico*

As listas de proteínas quantificadas por LC-MS/MS foram analisadas na plataforma OmicScope (<https://omicscope.ib.unicamp.br/>) e Nebula (<https://omicscope.ib.unicamp.br/Nebula>). Esta plataforma contém ferramentas capazes de realizar a análise estatística de dados ômicos, além de apresentar repositórios capazes de auxiliar na descoberta dos componentes moleculares, o nível de enriquecimento de vias e ontologia gênica presente nos dados inseridos. As bases de dados utilizadas para as análises de enriquecimento de vias bioquímicas nesta dissertação foram a *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) e *Elsevier pathway collection*.

6 | RESULTADOS

6.1 | Padronização do modelo de desmielinização *in vivo* induzido por cuprizona

Camundongos C57BL/6 machos com 8 semanas de idade foram expostos a cuprizona 0,2%. Com o intuito de observar as primeiras alterações comportamentais resultantes da desmielinização causada pela CUP, foram realizados os seguintes testes comportamentais após 3 e 5 semanas de exposição: teste de atividade locomotora no campo aberto, para avaliação dos prejuízos na locomoção, teste de interação social, para avaliação da cognição social, teste reconhecimento de objetos, para avaliação dos déficits cognitivos (memória de curta e longa duração).

Após 3 semanas de exposição à cuprizona, como é possível observar na **Figura 3 - A**, não houve diferença significativa na locomoção dos animais no teste de campo aberto, apenas uma redução no tempo de permanência no centro da arena no grupo dos animais cuprizona quando comparado com o grupo controle ($p < 0,05$; **Figura 3-G**).

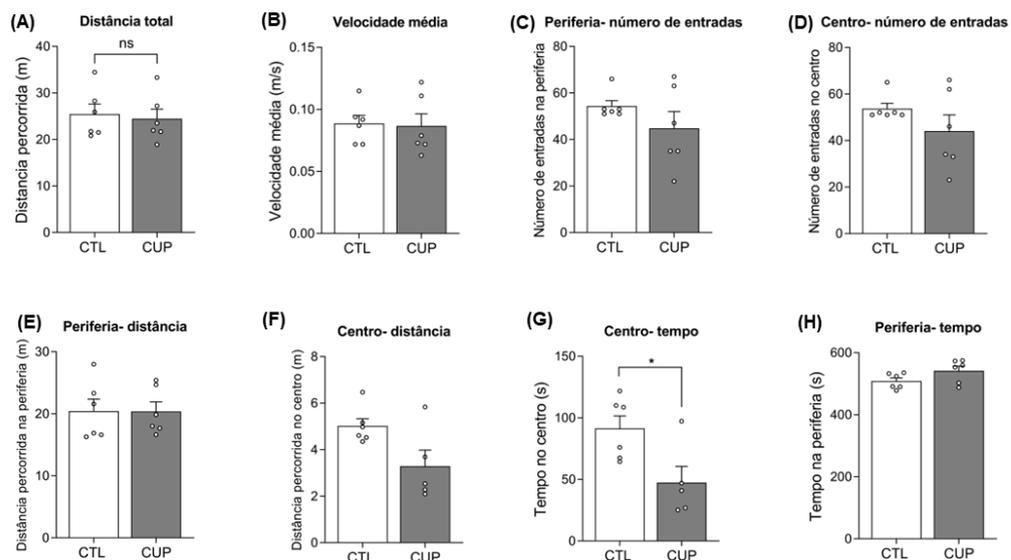


Figura 3: Avaliação da locomoção através do teste de Campo Aberto após 3 semanas de exposição à cuprizona. (A) Total da distância percorrida na arena, (B) média da velocidade de locomoção do animal. Número de entradas na (C) periferia e (D) no centro da arena. Tempo de permanência na (E) periferia e no (F) centro da arena. Total da distância percorrida no (G) centro da arena e na (H) periferia. O teste foi realizado 3 semanas após a exposição à cuprizona. Os dados estão expressos como média ± E.P.M. Teste t com correção de Welch. * $p < 0,05$ comparado com o grupo Controle (n= 5-7 animais por grupo).

Após 5 semanas de exposição dos animais à CUP, a avaliação do teste de campo aberto revelou que os animais não apresentaram prejuízo na locomoção, entretanto apresentaram diminuição na velocidade de locomoção (**Figura 3.1-B**), no número de entradas na periferia (**Figura 3.1-C**), no número de entradas e na distância percorrida no centro da arena (**Figura 3.1-D e H**).

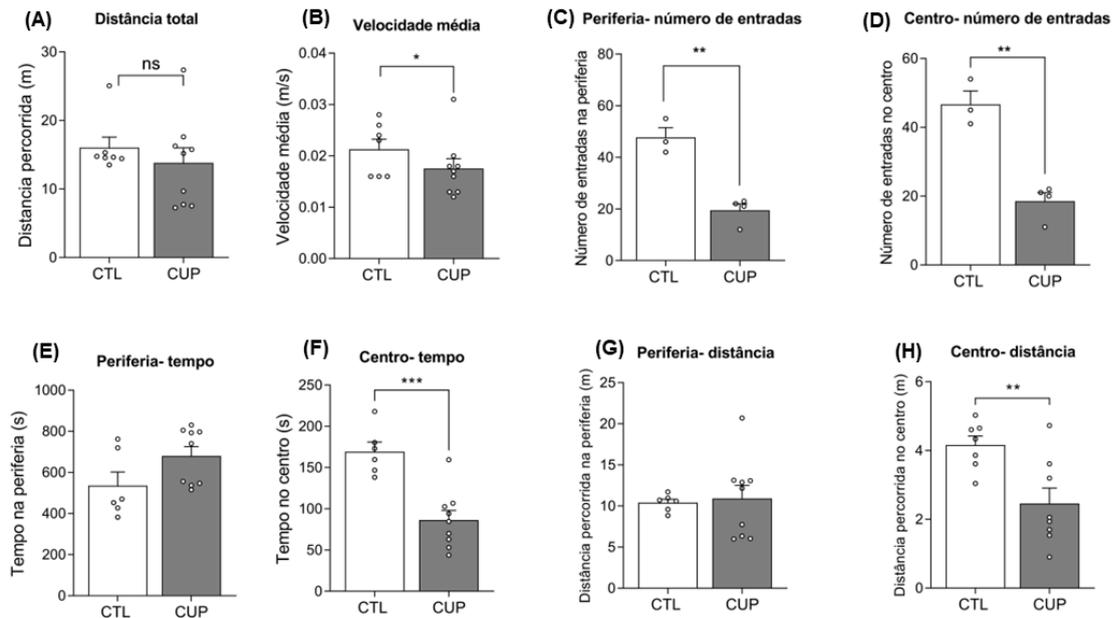


Figura 3.1: Avaliação da locomoção através do teste de Campo Aberto após 5 semanas de exposição à cuprizona. (A) Total da distância percorrida na arena e (B) média da velocidade de locomoção do animal. Número de entradas na (C) periferia e (D) no centro da arena. Tempo de permanência na (E) periferia e no (F) centro da arena. Total da distância percorrida na (G) periferia e no (H) centro da arena. O teste foi realizado em 5 semanas de exposição à cuprizona. Os dados estão expressos como média ± E.P.M. Teste t com correção de Welch. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ comparado com o grupo Controle ($n = 5-7$ animais por grupo).

No teste de reconhecimento de objeto foi possível observar que os animais expostos à cuprizona apresentaram prejuízo quanto à memória de curta e longa duração ($p < 0,001$; **Figura 3.2 - A e B**). Em relação a avaliação da interação social, houve uma redução significativa no tempo de interação dos animais expostos à cuprizona quando comparados com o grupo controle (**Figura 3.2-C**).

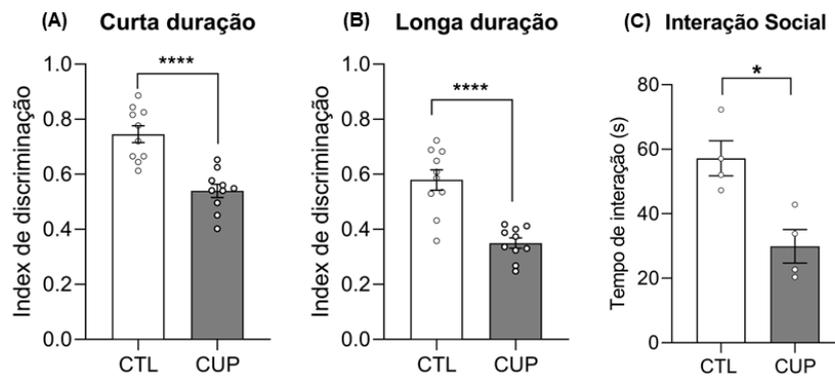


Figura 3.2: Avaliação do reconhecimento de objeto e interação social após 5 semanas de exposição à cuprizona. (A) Memória de curta duração e (B) longa duração. (C) Interação social. Os dados estão expressos como média ± E.P.M. do índice de discriminação (n=3-5 animais por grupo). Teste t com correção de Welch. * $p < 0,05$; **** $p < 0,001$ comparado com o grupo Controle (n= 5- 7 animais por grupo).

Além das análises comportamentais, a análise molecular por citometria de fluxo, utilizando o marcador específico de oligodendrócitos para a proteína básica da mielina (MBP), revelou uma redução dos níveis de MBP no hipocampo dos animais expostos à cuprizona em comparação com o grupo controle, indicando uma desmielinização no hipocampo ocasionada pelo modelo (média e mediana MFI, $p < 0,01$; **Figura 3.3**).

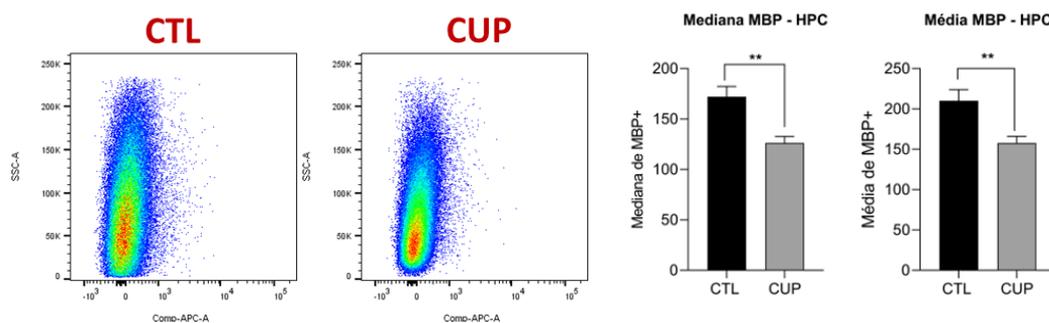


Figura 3.3: Avaliação da mediana e média de intensidade de fluorescência para MBP através da citometria de fluxo no hipocampo. Os dados estão expressos como média ± E.P.M. Teste t com correção de Welch. ** $p < 0,01$ comparado com o grupo Controle (n= 3-5 animais por grupo). Estratégia de marcação da análise para MBP+ (SSC-A vs APC-A), através da técnica de citometria de fluxo.

6.2 | Efeitos comportamentais do tratamento com clozapina em camundongos expostos à cuprizona

A partir da 3ª semana de exposição à cuprizona 0,2%, os camundongos C57BL/6 machos com 8 semanas de idade foram tratados com clozapina por 2 semanas. Ao final do tratamento foram avaliados os aspectos comportamentais mencionados anteriormente, dos animais no modelo e após o tratamento com clozapina. Como é possível observar na **Figura 3.4**, não houve diferença significativa na distância percorrida (A), velocidade (B), e tempo de permanência no centro (C) e na periferia (D), sugerindo que não houve prejuízo na locomoção dos animais após a exposição à cuprizona (CUP) e tratamento com clozapina (CLZ; CUP+CLZ) quando comparados com o controle (CTL).

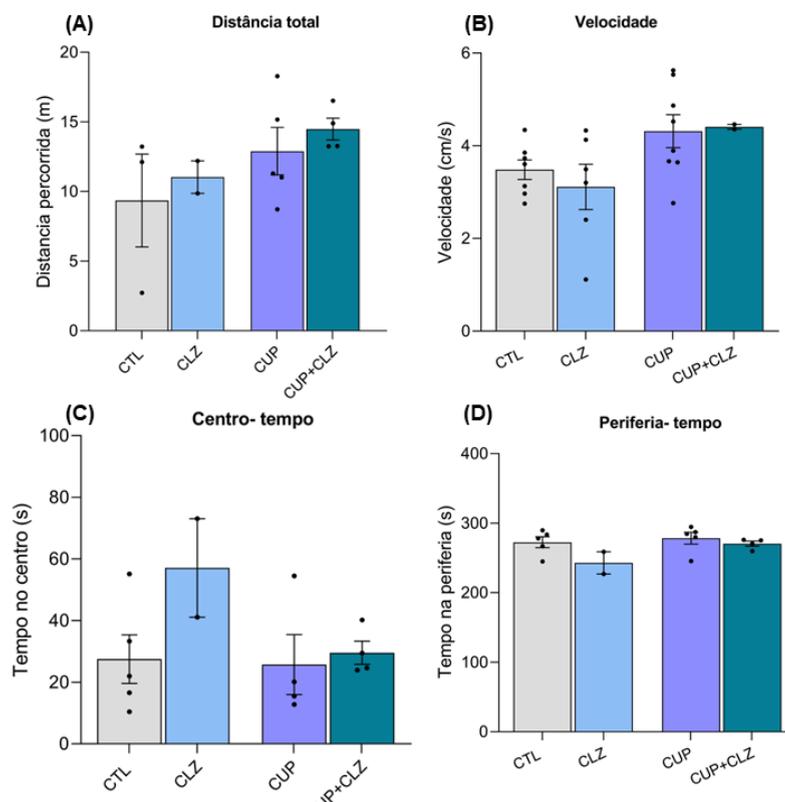


Figura 3.4: Avaliação da locomoção através do teste de Campo Aberto após 2 semanas de tratamento com clozapina 10mg/kg via i.p a partir da 3ª semana de exposição à cuprizona. O gráfico expressa (A) distância percorrida, (B) velocidade, (C) tempo de permanência no centro e (D) tempo de permanência na periferia. Os dados estão expressos como média \pm E.P.M. Teste t com correção de Welch ($n= 5-8$ animais por grupo).

O teste de reconhecimento de objeto foi utilizado com o intuito de avaliar o efeito da cuprizona em relação ao prejuízo cognitivo e o efeito da clozapina na recuperação deste. Foi possível observar que os animais expostos à cuprizona apresentaram prejuízos quanto à memória de curta e longa duração, quando comparados ao grupo controle e o tratamento com clozapina (cuprizona+clozapina) reverteu o prejuízo cognitivo desencadeado pela exposição à cuprizona (**Figura 3.5-A e B**). Portanto, a clozapina foi capaz de melhorar o prejuízo na memória de curta duração (Fator interação: $p=0.0045$ e Fator cuprizona: $p=0.0004$) e na

memória de longa duração (Fator de interação: $p=0.0177$; Fator cuprizona: $p=0.0445$ e Fator tratamento: $p=0.0108$) desencadeado pela exposição à cuprizona.

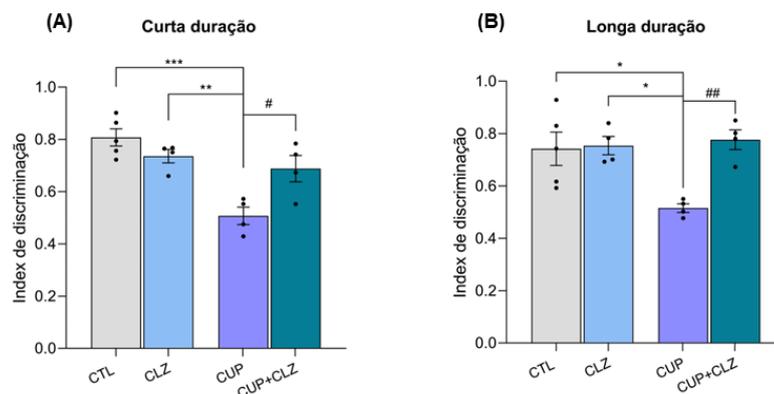


Figura 3.5: Avaliação do Reconhecimento de Objetos após tratamento com clozapina. (A) memória de curta duração e (B) memória de longa duração após 2 semanas de tratamento com clozapina 10mg/kg via i.p a partir da 3ª semana de exposição à cuprizona. Os dados estão expressos como média \pm E.P.M. ($n=3-5$ animais por grupo). ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Tukey. $**p<0,01$ e $****p<0,0001$ comparado com o grupo Controle; # $p<0,05$ e ## $p<0,01$ comparado com o grupo cuprizona (CUP).

Já na análise do teste de interação social, foi possível observar que os animais expostos à cuprizona apresentaram uma redução no tempo de interação com o intruso quando comparado ao grupo controle ($p<0,001$), e o tratamento com clozapina (cuprizona+clozapina) reverteu esse prejuízo na interação social ocasionado pela cuprizona ($p<0,05$; **Figura 3.6**). Logo, a clozapina foi capaz de melhorar o prejuízo na interação social desencadeado pela exposição à cuprizona (Fator interação: $p<0.0001$; Fator cuprizona: $p=0.0262$).

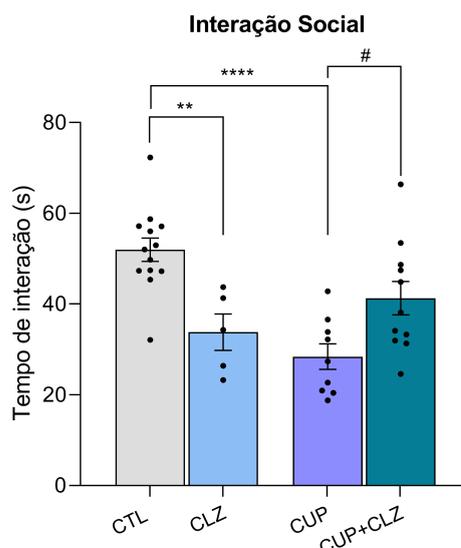


Figura 3.6: Avaliação do teste de Interação Social após 2 semanas de tratamento com clozapina 10mg/kg via i.p a partir da 3ª semana de exposição à cuprizona. Os dados estão expressos como média ± E.P.M. (n=6-13 animais por grupo). ANOVA de duas vias seguidas pelo pós-teste de Tukey. **p<0,01 e ***p<0,0001 comparado com o grupo Controle; # p<0,05 comparado com o grupo CUP.

6.3 | Análise do perfil de reatividade de astrócitos nas regiões córtex, córtex pré-frontal e hipocampo por RT-qPCR

Após a exposição à cuprizona 0,2% e o tratamento de 2 semanas com clozapina, foi realizada a análise da expressão de 10 genes descritos na literatura recente como parte de um painel marcador da reatividade de astrócitos (Liddelow *et al.*, 2017; Escartin *et al.*, 2021; Labib *et al.*, 2022), com intuito de avaliar se a clozapina é capaz de modular o estado reativo dos astrócitos no modelo da cuprizona.

No córtex foi possível observar que houve alteração significativa na expressão de 9 dos 10 genes pertencentes ao painel marcador escolhido, sendo o gene *Lcn2* o único que não apresentou alteração significativa de expressão nesta região (**Figura 4**). Na análise ANOVA de duas vias observamos que a exposição à cuprizona foi significativa na expressão de 7 dos 10 genes: *Aldoc* (Fator cuprizona: p<0,0001), *Chi3ll* (Fator cuprizona: p<0,0001), *Eaat1* (Fator cuprizona: p=0,0007), *Gfap* (Fator cuprizona: p<0,0001), *Slpr3* (Fator cuprizona: p=0,0069), *Serpina3n* (Fator cuprizona: p<0,0001) e *Srgn* (Fator cuprizona: p=0,0006), porém não houve diferença no fator clozapina e interação.

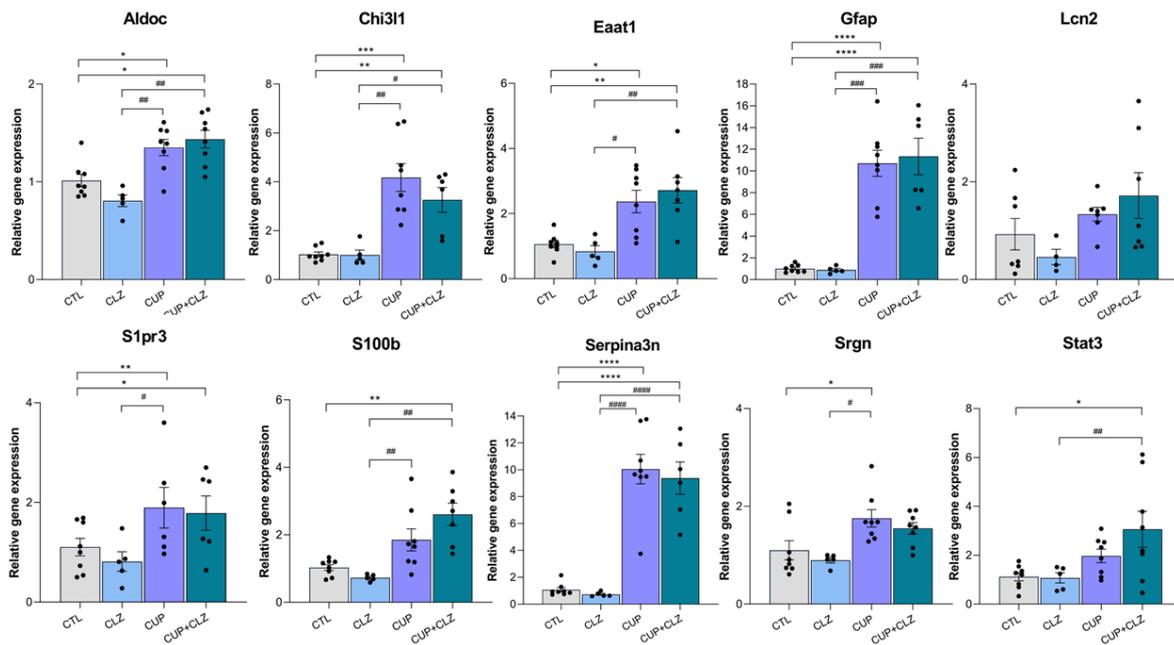


Figura 4: Expressão de RNAm dos genes marcadores da reatividade de astrócitos no córtex após 5 semanas de exposição à cuprizona, sendo 2 semanas de tratamento com clozapina 10mg/kg via i.p. a partir da 3ª semana de exposição. Os níveis de expressão de RNAm de cada gene foram normalizados com a média geométrica dos controles endógenos Actb e Hprt. Os dados foram representados como média \pm E.P.M., $n = 4-8$ animais por grupo. Anova de duas-vias seguidas de pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ comparado com o grupo controle; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$, #### $p < 0,0001$ comparado com o grupo CLZ.

No córtex pré-frontal foi possível observar que houve alteração significativa na expressão de 8 dos 10 genes pertencentes ao painel marcador escolhido, sendo os genes *Lcn2* e *S1pr3* os que não apresentaram alteração significativa de expressão nesta região (**Figura 4.1**). Na análise ANOVA de duas vias observamos que a exposição à cuprizona foi significativa na expressão de 6 dos 10 genes: *Aldoc* (Fator cuprizona: $p < 0,0001$), *Chi3l1* (Fator cuprizona: $p < 0,0001$), *Gfap* (Fator cuprizona: $p < 0,0001$), *Serpina3n* (Fator cuprizona: $p < 0,0001$), *Srgn* (Fator cuprizona: $p = 0,0004$) e *Stat3* (Fator cuprizona: $p < 0,0001$), porém não houve diferença no fator clozapina e interação.

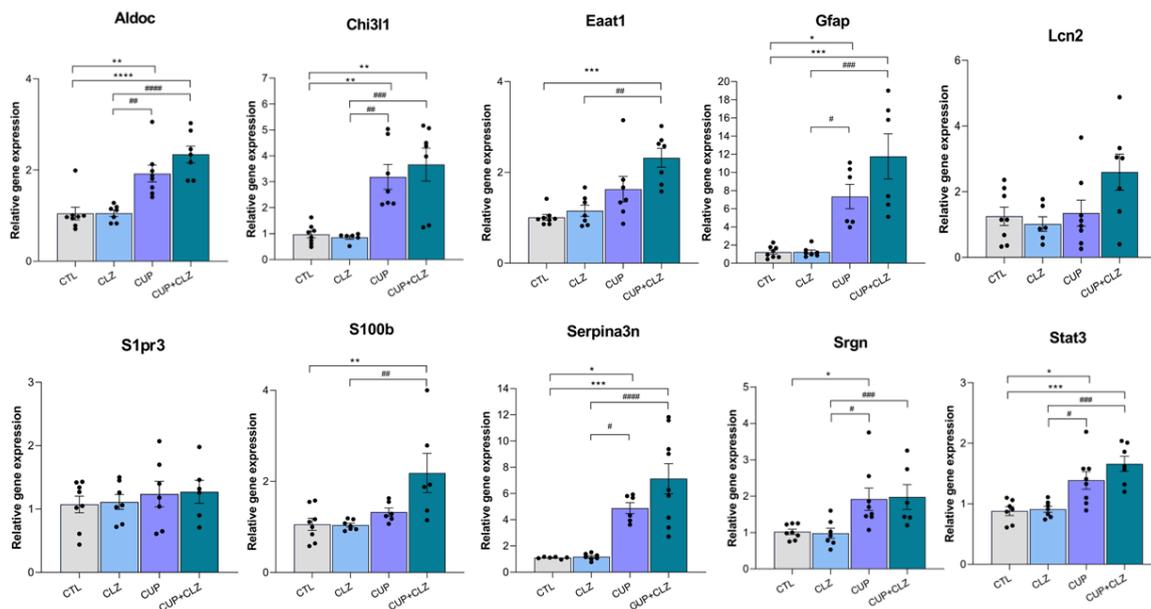


Figura 4.1: Expressão de RNAm dos genes marcadores da reatividade de astrócitos no córtex pré-frontal após 5 semanas de exposição à cuprizona, sendo 2 semanas de tratamento com clozapina 10mg/kg via i.p. a partir da 3ª semana de exposição. Os níveis de expressão de RNAm de cada gene foram normalizados com a média geométrica dos controles endógenos Actb e Hprt. Os dados foram representados como média \pm E.P.M., $n = 4-8$ animais por grupo. Anova de duas-vias seguidas de pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ comparado com o grupo controle; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$, #### $p < 0,0001$ comparado com o grupo CLZ.

No hipocampo foi possível observar que houve alteração significativa na expressão de todos os genes pertencentes ao painel marcador escolhido (**Figura 4.2**). Na análise ANOVA de duas vias observamos que a exposição à cuprizona foi significativa na expressão de todos os genes: *Aldoc* (Fator cuprizona: $p < 0,0001$), *Chi31* (Fator cuprizona: $p < 0,0001$), *Eaat1* (Fator cuprizona: $p < 0,0001$), *Gfap* (Fator cuprizona: $p < 0,0001$), *Lcn2* (Fator cuprizona: $p = 0,0013$), *S1rp3* (Fator cuprizona: $p < 0,0001$), *S100b* (Fator cuprizona: $p = 0,0001$), *Serpina3n* (Fator cuprizona: $p < 0,0001$), *Srgn* (Fator cuprizona: $p < 0,0001$) e *Stat3* (Fator cuprizona: $p < 0,0001$), entretanto não houve diferença no fator clozapina e interação.

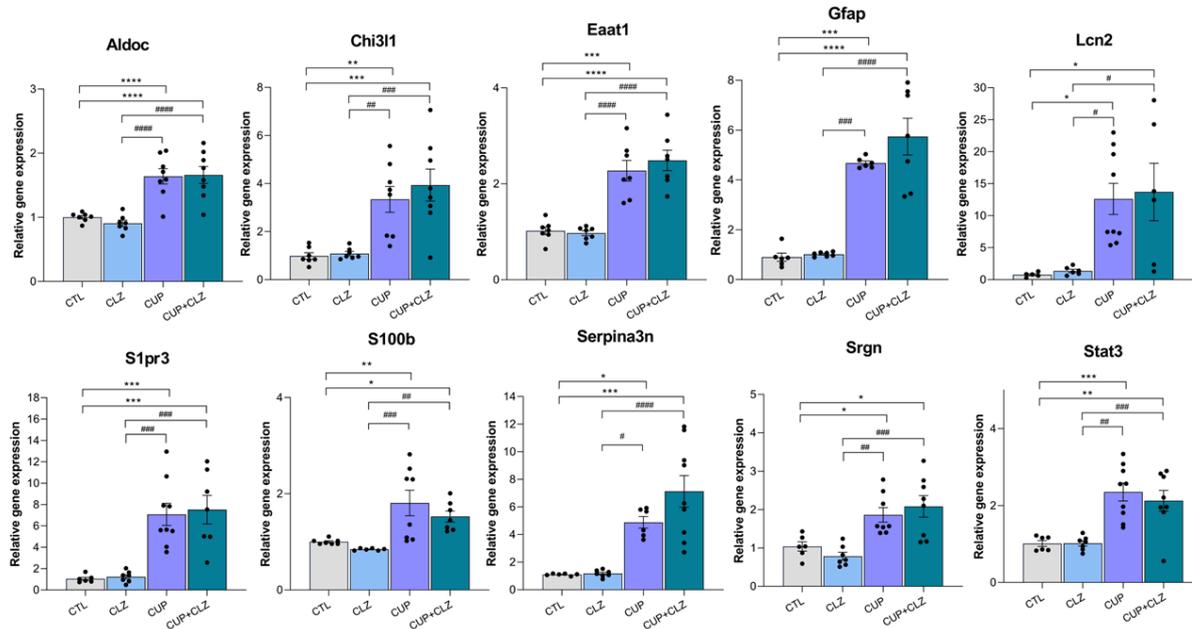


Figura 4.2: Expressão de RNAm dos genes marcadores da reatividade de astrócitos no hipocampo após 5 semanas de exposição à cuprizona, sendo 2 semanas de tratamento com clozapina 10mg/kg via i.p. a partir da 3^a semana de exposição. Os níveis de expressão de RNAm de cada gene foram normalizados com a média geométrica dos controles endógenos Actb e Hprt. Os dados foram representados como média \pm E.P.M., $n = 4-8$ animais por grupo. Anova de duas-vias seguidas de pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ comparado com o grupo controle; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$, #### $p < 0,0001$ comparado com o grupo CLZ.

6.4 | Análise qualitativa da reatividade de astrócitos através de imunofluorescência

A análise de imunofluorescência qualitativa foi realizada com o intuito de verificar a expressão de proteína fibrilar ácida (GFAP) no hipocampo dos animais durante a exposição à cuprizona e após o tratamento com a clozapina. As marcações foram realizadas com o marcador específico de GFAP, em secções coronais do hipocampo de camundongos expostos à cuprizona (CUP), controle (VEI) e cuprizona+clozapina (CUP_CLZ) (**Figura 5**).

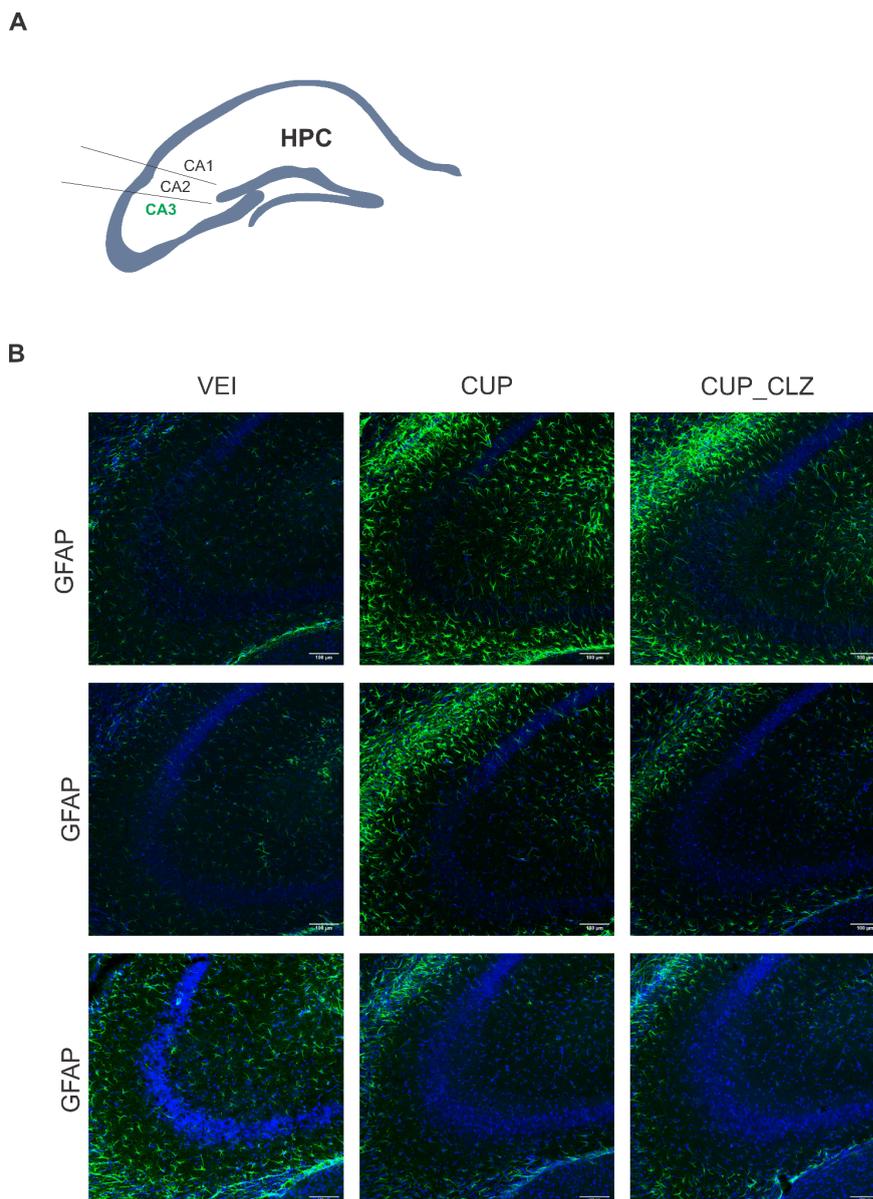


Figura 5: Expressão de GFAP na região CA3 do hipocampo em secção coronal após 5 semanas de exposição à cuprizona, sendo 2 semanas de tratamento com clozapina 10mg/kg via i.p. a partir da 3^a semana de exposição. (A) Figura esquemática do hipocampo (HPC) marcando em verde região CA3 onde a reatividade dos astrócitos foi analisada. (B) Astrócitos marcados com anticorpo anti-GFAP (em verde) nas condições controle (VEI), cuprizona (CUP) e cuprizona+clozapina (CUP_CLZ). Núcleos celulares marcados com DAPI (em azul). Escala: 100µm. n = 3.

Na **Figura 5** é possível observar uma tendência de aumento da expressão de GFAP, na região CA3 do hipocampo dos animais expostos à cuprizona (CUP), quando comparados ao controle (VEI). Após o tratamento com a clozapina há uma tendência de diminuição da expressão de GFAP, quando comparado o grupo cuprizona+clozapina (CUP_CLZ) com o

grupo cuprizona (CUP). Entretanto, no terceiro animal, observa-se que a expressão de GFAP parece se manter em ambos os grupos de comparação.

6.5 | Análise proteômica

6.5.1 | Identificação das proteínas diferencialmente expressas no córtex e hipocampo dos camundongos após exposição à cuprizona e tratamento com clozapina

Através da análise proteômica pudemos quantificar um total de 1128 proteínas no córtex e 1904 proteínas no hipocampo dos animais após 5 semanas de exposição à cuprizona (**Figura 6-A**) e após tratamento com clozapina (**Figura 6-B**). Após a exposição à cuprizona, identificamos um total de 243 proteínas diferencialmente expressas no córtex (CTX) e 353 no hipocampo (HPC) (**Figura 6-A**), enquanto que após e o tratamento com a clozapina, 228 proteínas estavam diferencialmente expressas no córtex (CTX) e 144 no hipocampo (HPC) (**Figura 6-B**).

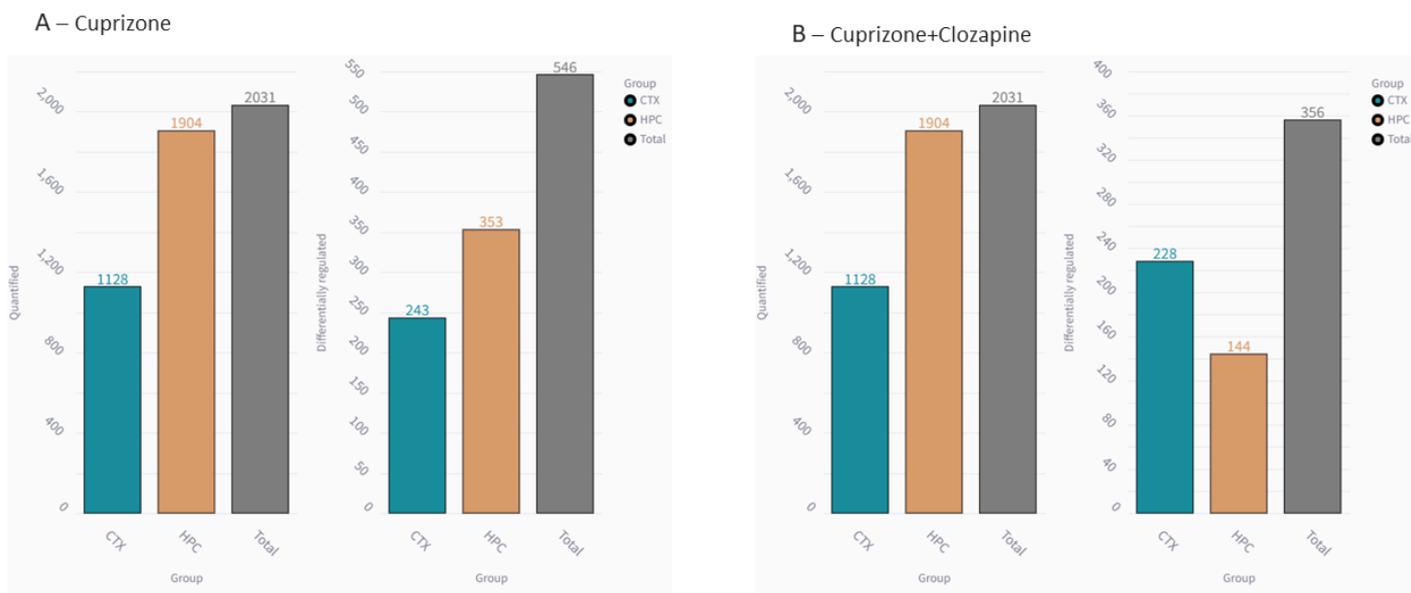


Figura 6: Distribuição das proteínas diferencialmente reguladas. (A) Total de proteínas quantificadas e diferencialmente expressas no córtex (CTX), hipocampo (HPC) e totais (CTX+HPC), de camundongos após 5 semanas de exposição à cuprizona. (B) Total de proteínas quantificadas e diferencialmente expressas no córtex (CTX), hipocampo (HPC) e totais (CTX+HPC), de camundongos tratados com clozapina 10mg/kg via i.p. por 2 semanas a partir da 3ª semana de exposição à cuprizona por 5 semanas. Córtex (CTX) representado em azul e hipocampo (HPC) representado em rosa.

Após a exposição à cuprizona, 214 proteínas estavam menos expressas no córtex (CTX) e 29 mais expressas (**Figura 6.1-A**), enquanto que no hipocampo (HPC) foram encontradas 272 proteínas menos expressas e 81 mais expressas (**Figura 6.1-A**). Após o tratamento com a clozapina, 84 proteínas estavam menos expressas no córtex (CTX) e 144 mais expressas (**Figura 6.1-B**), já no hipocampo (HPC), 71 proteínas estava menos expressas e 73 mais expressas (**Figura 6.1-B**).

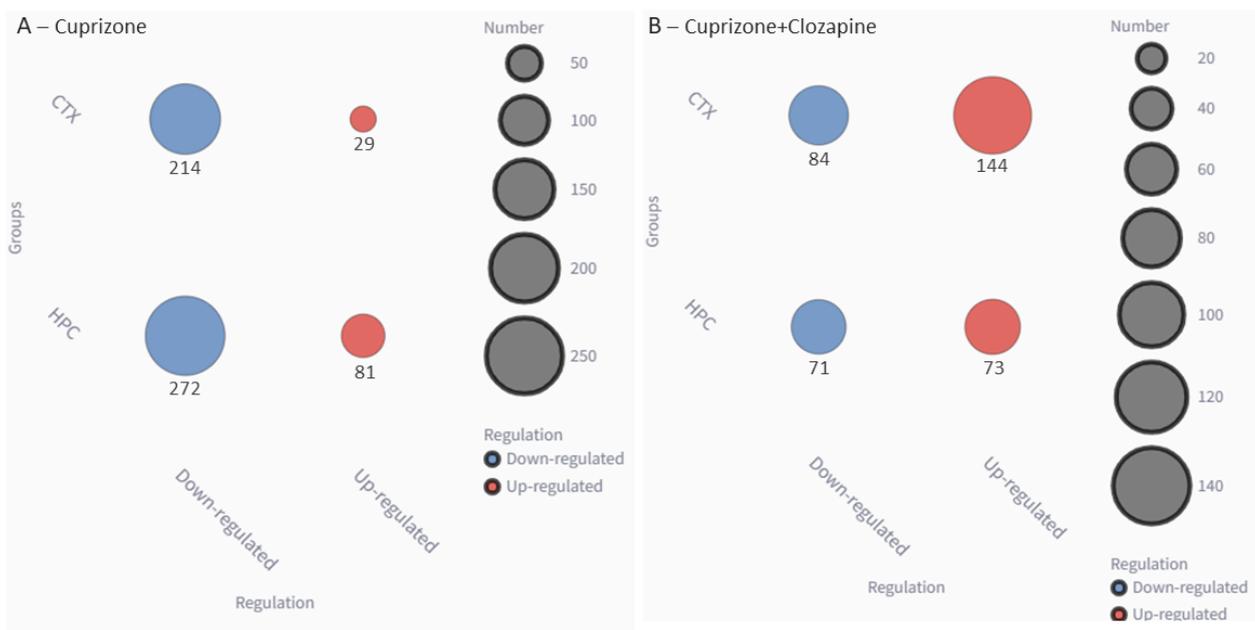


Figura 6.1: Distribuição das proteínas diferencialmente reguladas. (A) Total de proteínas mais e menos expressas, no córtex (CTX), em azul, e hipocampo (HPC), em vermelho, de camundongos após 5 semanas de exposição à cuprizona. (B) Total de proteínas infra- e mais expressas, no córtex (CTX), em azul, e hipocampo (HPC), em vermelho, de camundongos tratados com clozapina 10mg/kg via i.p. por 2 semanas a partir da 3ª semana de exposição à cuprizona por 5 semanas.

Em relação a intersecção das proteínas diferencialmente reguladas, observamos que 50 proteínas foram reguladas em comum entre o córtex e hipocampo, após a exposição dos animais à cuprizona (**Figura 6.2**). Sendo que, 303 proteínas foram reguladas exclusivamente no hipocampo e 193 no córtex (**Figura 6.2**).

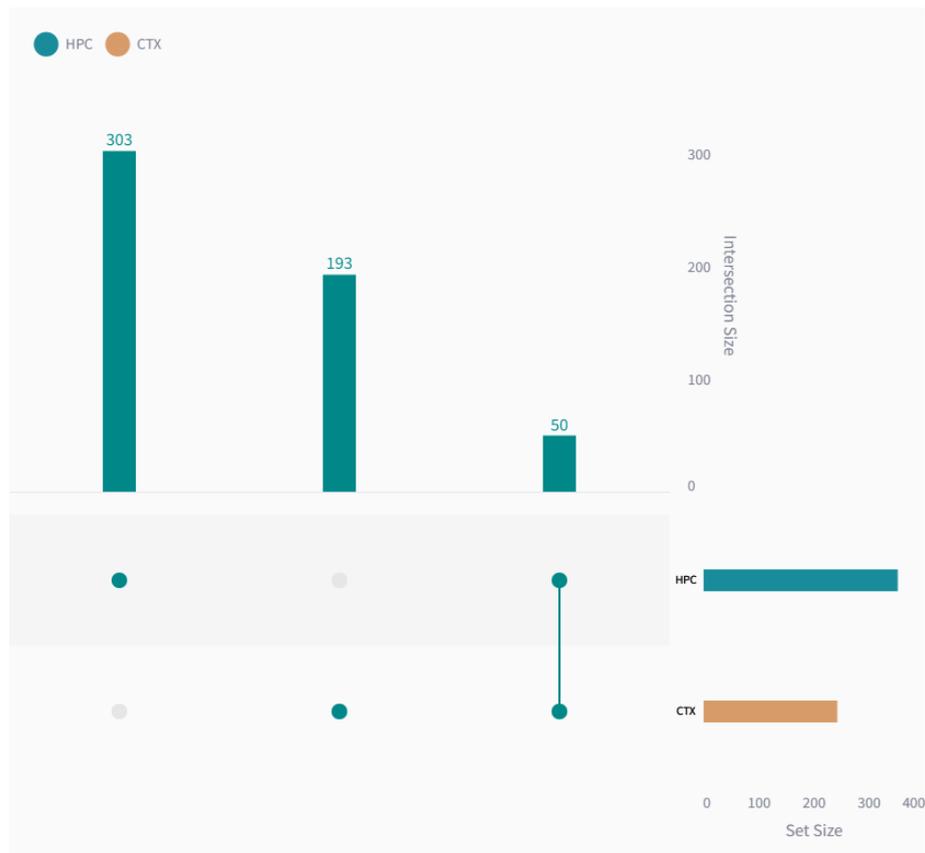


Figura 6.2: Gráfico UpSet mostrando a intersecção das proteínas diferencialmente expressas após exposição à cuprizona. As barras na vertical mostram a quantidade de proteínas diferencialmente expressas exclusivamente em cada região e a intersecção. As proteínas diferencialmente expressas em comum em cada região é representada pela interligação das duas regiões pela linha vertical. As barras na horizontal mostram o conjunto total de proteínas diferencialmente expressas em cada região. Em azul, hipocampo (HPC) e em rosa, córtex (CTX).

Já após o tratamento com a clozapina, 16 proteínas foram reguladas em comum entre o córtex e hipocampo, 128 proteínas reguladas exclusivamente no hipocampo e 212 no córtex (**Figura 6.3**).

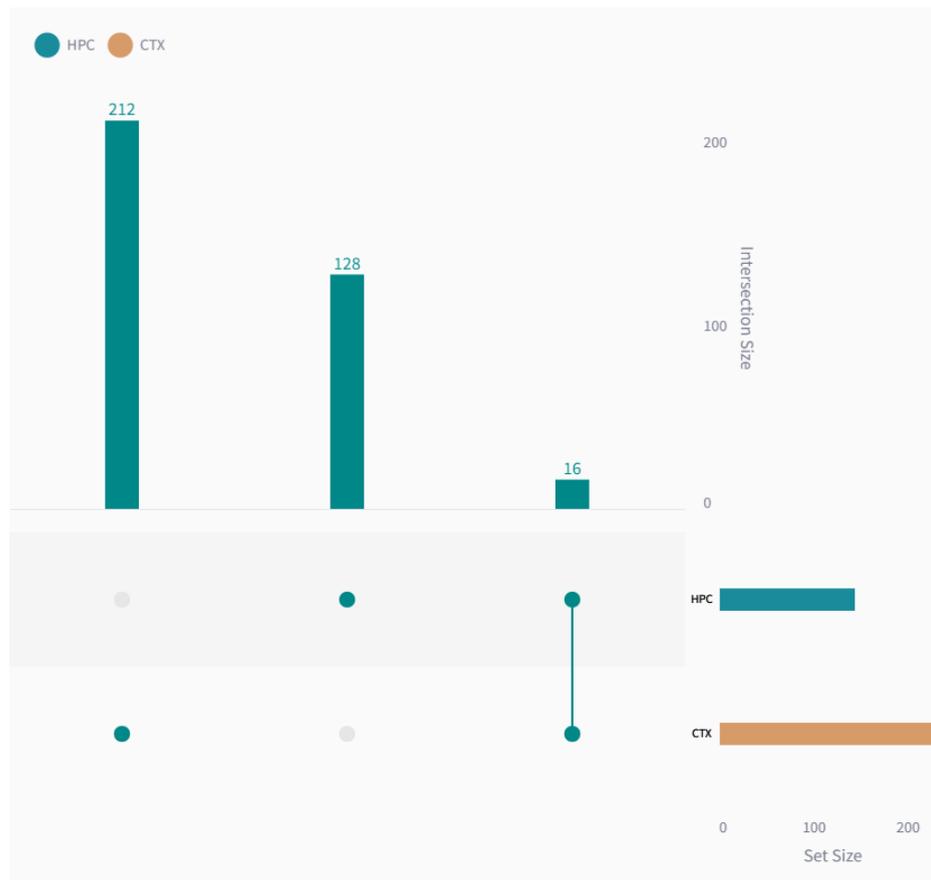


Figura 6.3: Gráfico UpSet mostrando a intersecção das proteínas diferencialmente expressas após tratamento com a clozapina. As barras na vertical mostram a quantidade de proteínas diferencialmente expressas exclusivamente em cada região e a intersecção. As proteínas diferencialmente expressas em comum em cada região é representada pela interligação das duas regiões pela linha vertical. As barras na horizontal mostram o conjunto total de proteínas diferencialmente expressas em cada região. Em azul, hipocampo (HPC) e em rosa, córtex (CTX).

6.5.2 | Identificação das proteínas e vias bioquímicas moduladas no córtex e hipocampo dos camundongos após exposição à cuprizona

Para a análise de enriquecimento de vias após exposição à cuprizona, as proteínas significativamente alteradas foram analisadas através do banco de dados *Elsevier pathway collection* e *KEGG*. Para todas as análises de enriquecimento, os termos e vias foram considerados significativamente relevantes quando ANOVA ($p \leq 0.05$) (após o ajuste para múltiplos testes por Benjamini–Hochberg).

Nós observamos um total de 84 vias bioquímicas significativamente enriquecidas no córtex (CTX) e 277 no hipocampo (HPC), na base de dados *Elsevier pathway collection*. Optamos por representar os 33 termos mais relevantes na **Figura 7**. Dentre os termos

representados na **Figura 7**, destacam-se as vias relacionadas a astrocitoma, como “*Astrocytoma*”, glioblastoma, como “*Glioblastoma, Secondary*”, oligodendrócitos, como “*MBP/MOG/PLP in Immune System Activation*” e sinalizações por glutamato, como “*Glutamate overdose and Aura Effect...*” (**Figura 7**).

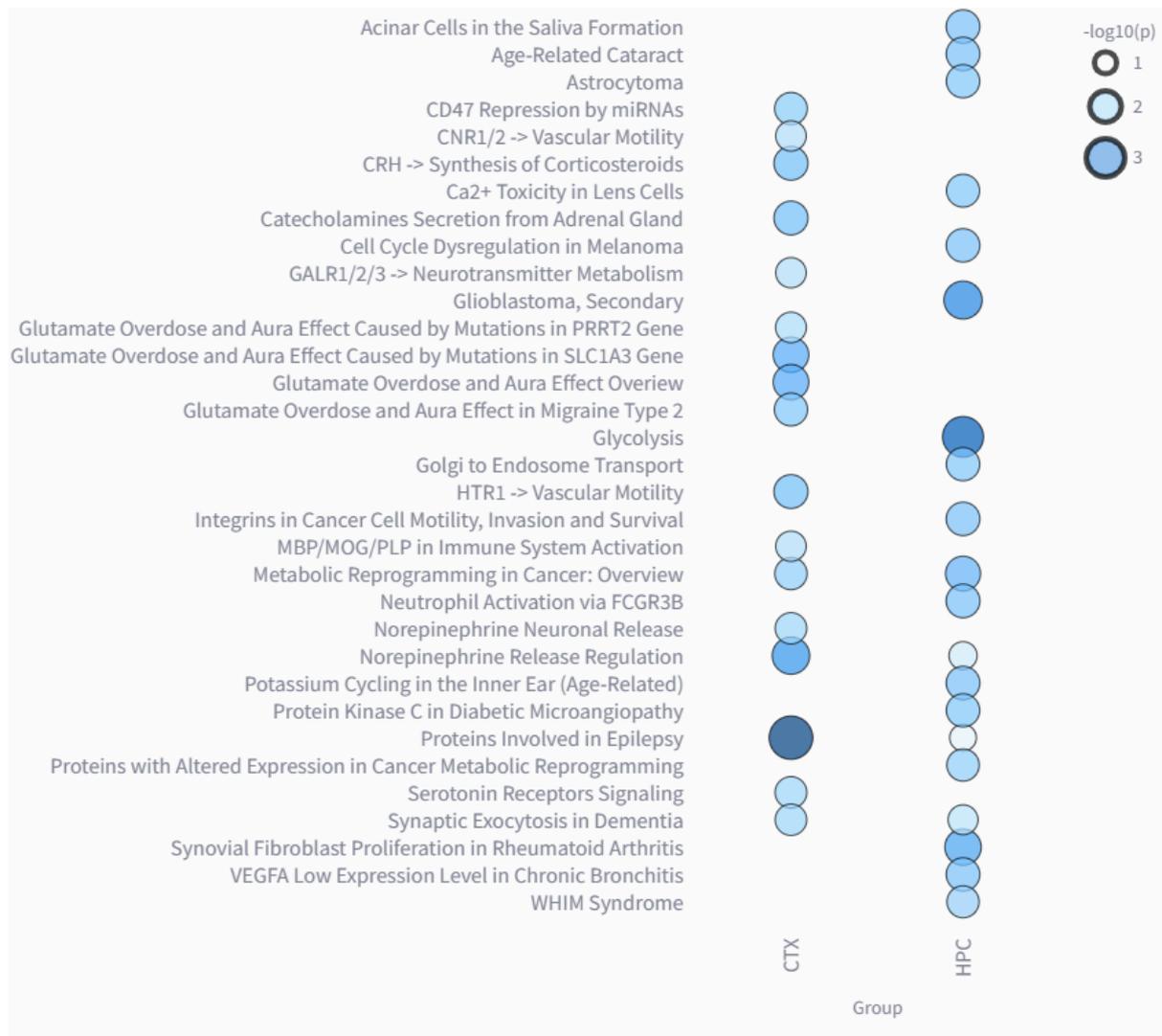


Figura 7: As 33 principais vias bioquímicas enriquecidas (Elsevier pathway collection) no córtex (CTX) e hipocampo (HPC) de camundongos após exposição à cuprizona. A circunferência e cor dos círculos representam a relevância estatística da via em $-\log_{10}(p)$ sendo consideradas estatisticamente relevantes as vias com ANOVA ($p \leq 0.05$). Enriquecimento de vias através da base de dados *Elsevier pathway collection*.

As proteínas e seus respectivos níveis de expressão na via de glioblastoma e oligodendrócitos podem ser observadas na **Figura 7.1**, astrocitoma (**Figura 7.2**) e sinalizações por glutamato (**Figura 7.3**), todas representadas no diagrama de corda.

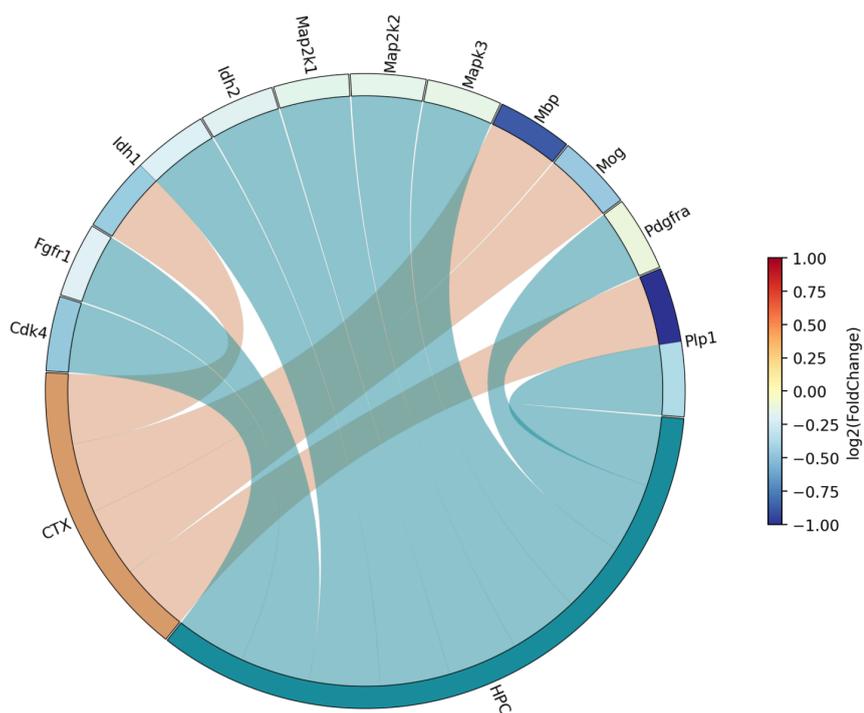


Figura 7.1: Diagrama de cordas representando a localização e o nível de expressão das proteínas envolvidas na via de Glioblastoma e oligodendrócitos (ANOVA ($p \leq 0.05$) após exposição à cuprizona. As cores das proteínas indicam seus níveis de expressão em $2\log$ (Fold Change), enquanto as cordas destacam se foram encontradas alteradas no hipocampo (HPC), em azul ou córtex (CTX), em rosa.

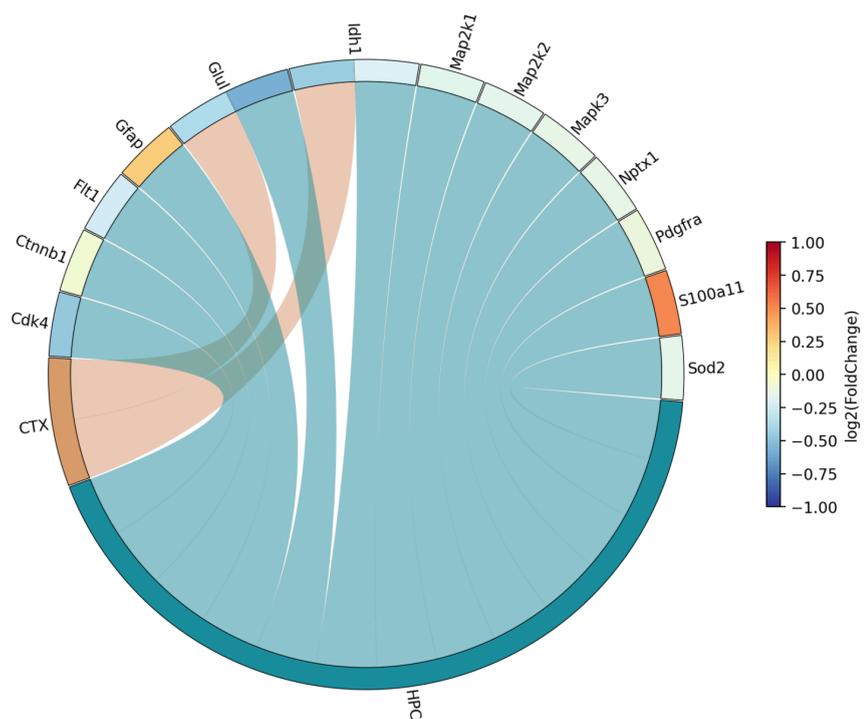


Figura 7.2: Diagrama de cordas representando a localização e o nível de expressão das proteínas envolvidas na via de Astrocitoma (ANOVA ($p \leq 0.05$) após exposição à cuprizona. As cores das proteínas indicam seus níveis de expressão em $2\log$ (Fold Change), enquanto as cordas destacam se foram encontradas alteradas no hipocampo (HPC), em azul ou córtex (CTX), em rosa.

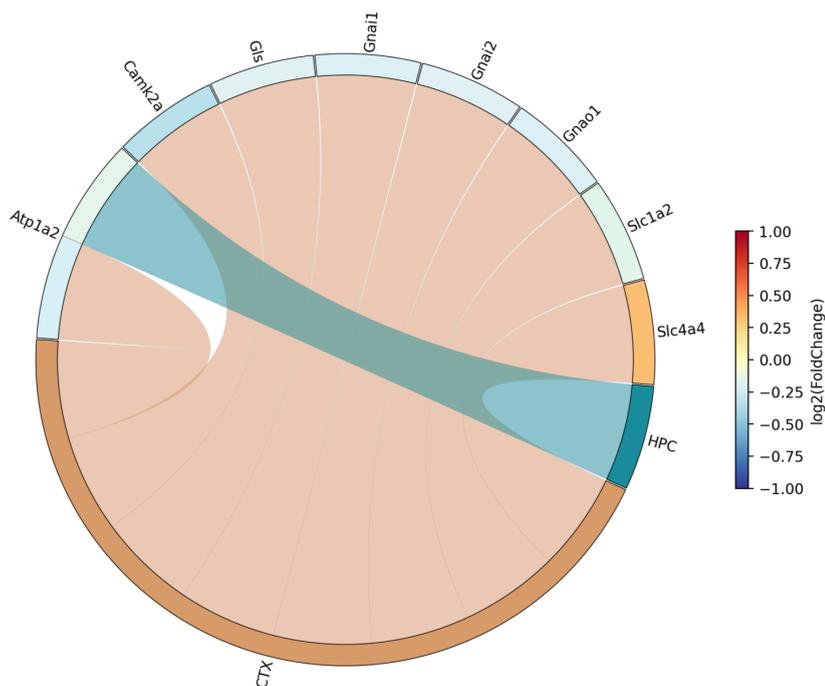


Figura 7.3: Diagrama de cordas representando a localização e o nível de expressão das proteínas envolvidas na via de Sinalizações por Glutamato (ANOVA ($p \leq 0.05$) após exposição à cuprizona. As cores das proteínas indicam seus níveis de expressão em $2\log$ (Fold Change), enquanto as cordas destacam se foram encontradas alteradas no hipocampo (HPC), em azul ou córtex (CTX), em rosa.

Na base de dados KEGG, nós observamos um total de 77 vias bioquímicas significativamente enriquecidas no córtex (CTX) e 115 no hipocampo (HPC). Optamos por representar os 24 termos mais relevantes na **Figura 7.4 e aprofundar a discussão** sobre as vias relacionadas ao metabolismo energético, como “*Glycolysis*” e “*Oxidative phosphorylation*”.

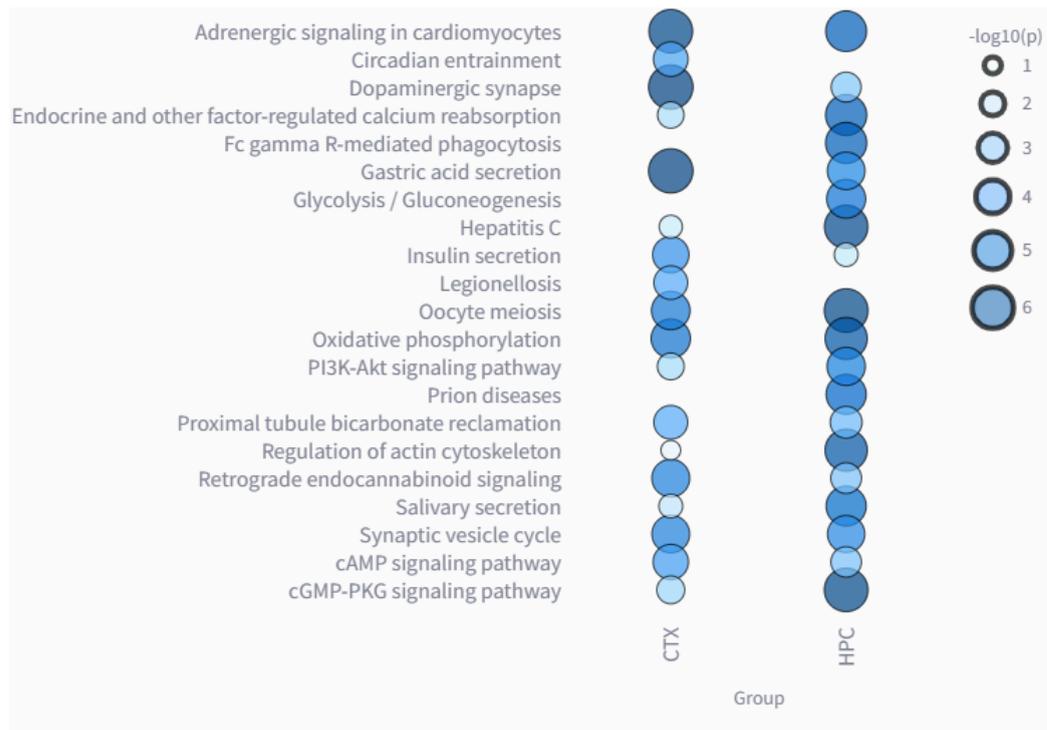


Figura 7.4: As 21 principais vias bioquímicas enriquecidas (KEGG) no córtex (CTX) e hipocampo (HPC) de camundongos após exposição à cuprizona. A circunferência e cor dos círculos representam a relevância estatística da via em $-\log_{10}(p)$ sendo consideradas estatisticamente relevantes as vias com ANOVA ($p \leq 0.05$). Enriquecimento de vias através da base de dados *KEGG*.

As proteínas e seus respectivos níveis de expressão na via relacionada ao metabolismo energético, como fosforilação oxidativa e glicólise/gliconeogênese podem ser observadas na **Figura 7.5**, representadas no diagrama de cordas.

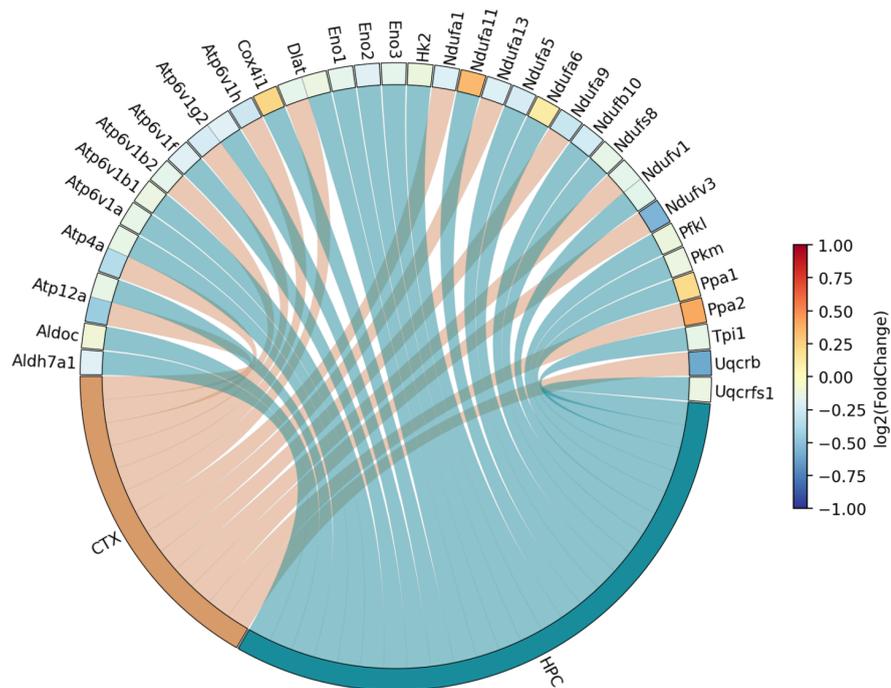


Figura 7.5: Diagrama de cordas representando a localização e o nível de expressão das proteínas envolvidas na via de Fosforilação Oxidativa e Glicólise/Gliconeogênese (ANOVA ($p \leq 0.05$) após exposição à cuprizona. As cores das proteínas indicam seus níveis de expressão em $2\log$ (Fold Change), enquanto as cordas destacam se foram encontradas alteradas no hipocampo (HPC), em azul ou córtex (CTX), em rosa.

6.5.3 | Identificação das proteínas e vias bioquímicas moduladas no córtex e hipocampo dos camundongos após tratamento com clozapina

Para a análise de enriquecimento de vias após o tratamento com clozapina, as proteínas significativamente alteradas foram analisadas através do banco de dados *KEGG* apenas, pois não houve enriquecimento de vias para região do hipocampo na base de dados *Elsevier pathway collection*. Para todas as análises de enriquecimento, os termos e vias foram considerados significativamente relevantes quando ANOVA ($p \leq 0.05$) (após o ajuste para múltiplos testes por Benjamini–Hochberg).

Nós observamos um total de 65 vias bioquímicas significativamente enriquecidas no córtex (CTX) e 12 no hipocampo (HPC). Na **Figura 8** estão representados os 23 termos mais relevantes. Dentre os termos representados na **Figura 8**, destacam-se as vias relacionadas a fosforilação oxidativa, como “*Oxidative phosphorylation*”, autofagia, como “*Autophagy*”, ferroptose, como “*Ferroptosis*”, sinapses glutamatérgicas e sistema endocanabinoide, como “*Retrograde endocannabinoid signaling*”.

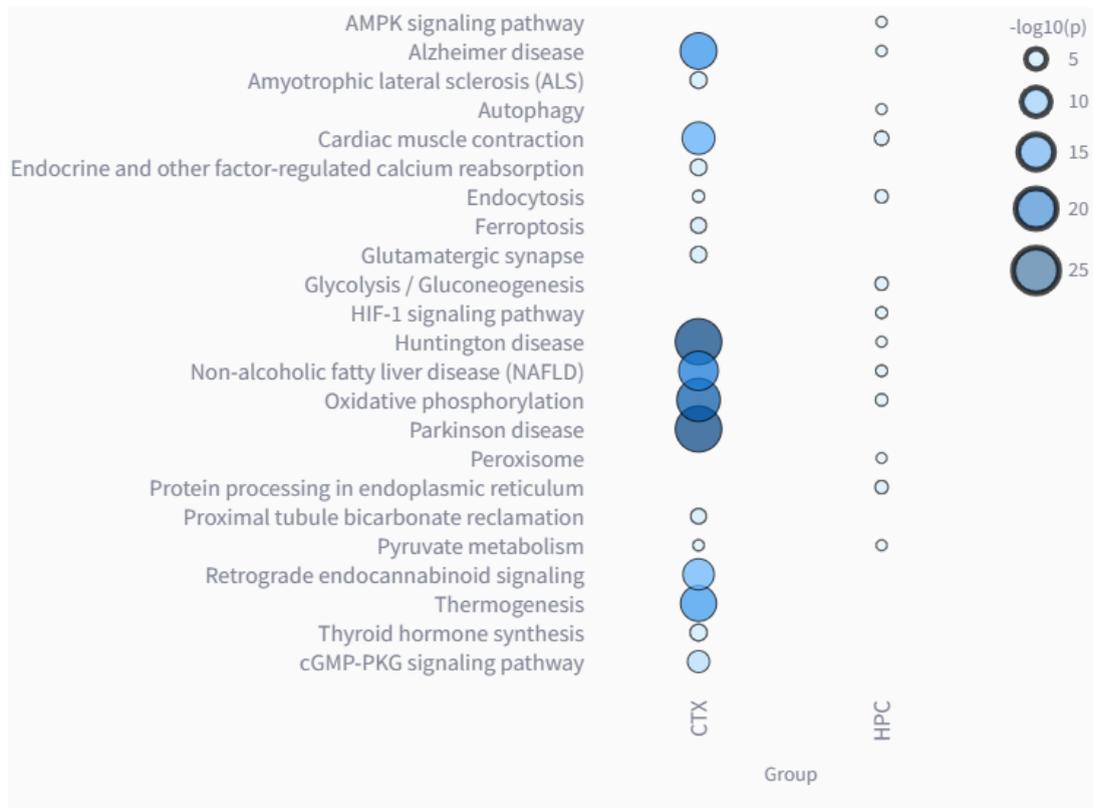


Figura 8: As 23 principais vias bioquímicas enriquecidas no córtex (CTX) e hipocampo (HPC) de camundongos após o tratamento com clozapina. A circunferência e cor dos círculos representam a relevância estatística da via em $-\log_{10}(p)$, sendo consideradas estatisticamente relevantes as vias com ANOVA ($p \leq 0.05$).

As proteínas e seus respectivos níveis de expressão na via de fosforilação oxidativa podem ser observadas na figura **Figura 8.1**, na autofagia (**Figura 8.2**), ferroptose (**Figura 8.3**) e sistema endocanabinoide (**Figura 8.4**). Todas representadas em diagrama de corda.

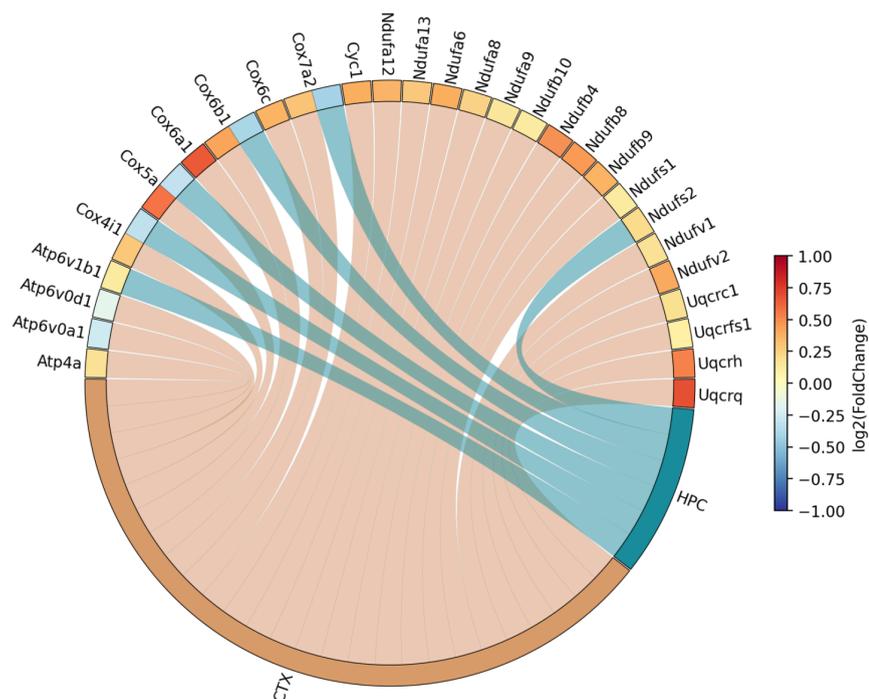


Figura 8.1: Diagrama de cordas representando a localização e o nível de expressão das proteínas envolvidas na via de Fosforilação oxidativa (ANOVA ($p \leq 0.05$) após tratamento com clozapina). As cores das proteínas indicam seus níveis de expressão em $2\log$ (Fold Change), enquanto as cordas destacam se foram encontradas alteradas no hipocampo (HPC), em azul ou córtex (CTX), em rosa.

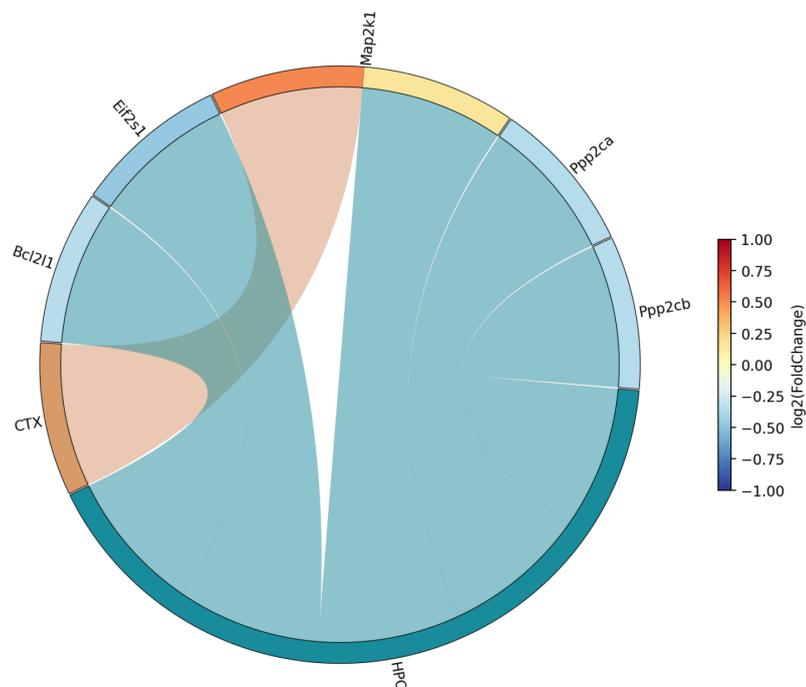


Figura 8.2: Diagrama de cordas representando a localização e o nível de expressão das proteínas envolvidas na via de Autofagia (ANOVA ($p \leq 0.05$) após tratamento com clozapina. As cores das proteínas indicam seus níveis de expressão em $2\log(\text{Fold Change})$, enquanto as cordas destacam se foram encontradas alteradas no hipocampo (HPC), em azul ou córtex (CTX), em rosa

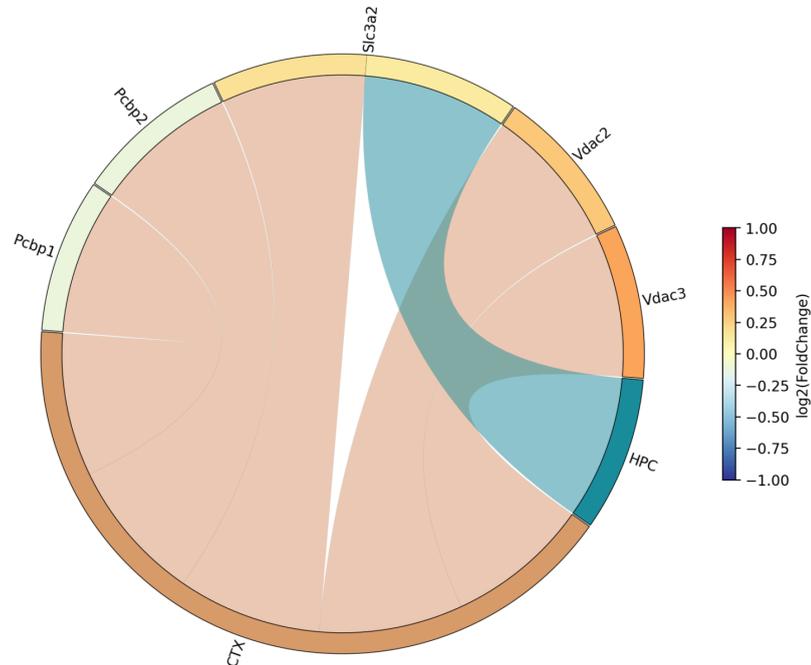


Figura 8.3: Diagrama de cordas representando a localização e o nível de expressão das proteínas envolvidas na via de Ferroptose (ANOVA ($p \leq 0.05$) após tratamento com clozapina.. As cores das proteínas indicam seus níveis de expressão em $2\log(\text{Fold Change})$, enquanto as cordas destacam se foram encontradas alteradas no hipocampo (HPC), em azul ou córtex (CTX), em rosa

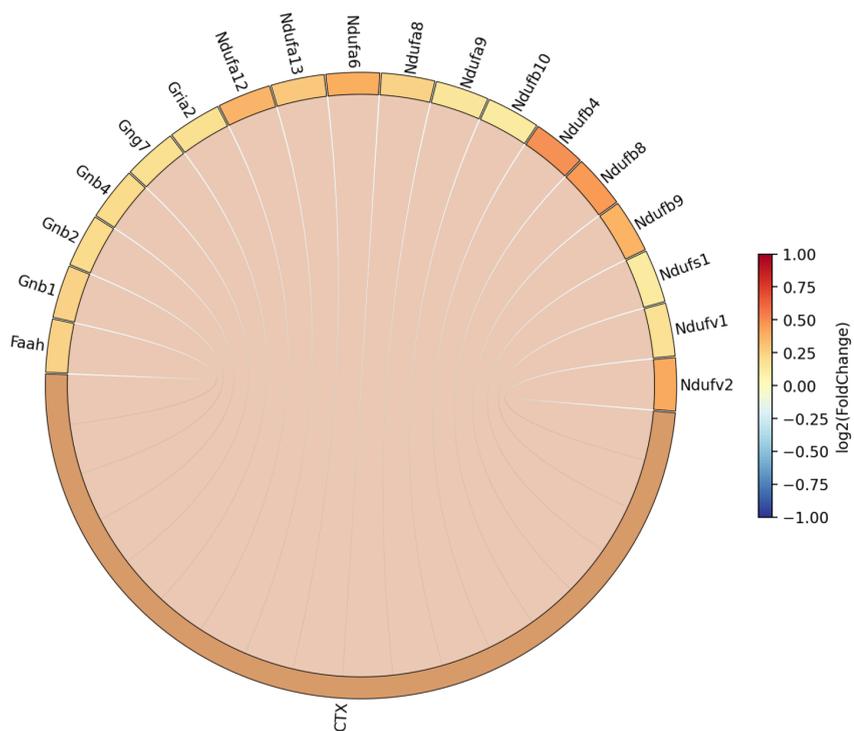


Figura 8.4: Diagrama de cordas representando a localização e o nível de expressão das proteínas envolvidas na via de Sistema Endocanabinoide (ANOVA ($p \leq 0.05$) após tratamento com clozapina. As cores das proteínas indicam seus níveis de expressão em $2\log(\text{Fold Change})$, enquanto as cordas destacam se foram encontradas alteradas no hipocampo (HPC), em azul ou córtex (CTX), em rosa.

7| DISCUSSÃO

Neste trabalho investigamos por meio de testes comportamentais, RT-qPCR e LC-MS/MS, as alterações no padrão de reatividade astrocitária, através da análise dos genes e proteínas expressos em diferentes regiões cerebrais de camundongos após exposição à neurotoxina desmielinizante cuprizona e tratamento com o antipsicótico clozapina. Nosso objetivo foi descobrir a influência da clozapina na modulação do painel gênico relacionado ao perfil reativo neurotóxico dos astrócitos e também no proteoma, para identificar as proteínas e vias relacionadas ao mecanismo de ação deste fármaco.

7.1| Modulação da reatividade astrocitária no córtex pré-frontal, córtex e hipocampo

Com relação ao painel marcador da reatividade dos astrócitos, nós observamos o aumento da expressão da maioria dos genes relacionados ao perfil reativo dos astrócitos no córtex e córtex pré-frontal (**Figuras 4 e 4.1** respectivamente), bem como o aumento na expressão de todos estes genes na região do hipocampo (**Figura 4.2**) dos animais após a exposição à cuprizona. Essa diferença na quantidade de genes modulados entre córtex e córtex pré-frontal em comparação ao hipocampo, pode ser explicada pelo fato de que no modelo da cuprizona, no córtex e em outras regiões da substância cinzenta, a ativação da microglia e reatividade dos astrócitos é menos severa (Zhan *et al.*, 2020).

Nossas análises da expressão dos genes específicos para o perfil de reatividade dos astrócitos não demonstraram significância estatística do fator clozapina e tratamento, sendo apenas o fator cuprizona significativo no aumento da expressão dos genes. De forma geral, a reatividade astrocitária é bem estabelecida no modelo da cuprizona (Kipp, 2023). Entretanto, a descrição de um painel molecular marcador mais específico da reatividade dos astrócitos, neste modelo, ainda não é bem documentada.

A análise da reatividade astrocitária através da medição da expressão de *Gfap*/GFAP é a mais bem estabelecida no modelo (Zhan *et al.*, 2020; Schröder *et al.*, 2023). Porém, análises incluindo a expressão de *Lcn2* e *S100b* (de los Angeles Castillo-Rodriguez *et al.*, 2022), *Chi311* (Ahmad *et al.*, 2023), *Stat3* (Toutouna *et al.*, 2016; Elbaz *et al.*, 2018; Ohgomori and Jinno, 2021) e *Eaat1* (Azami *et al.*, 2013) também já foram documentadas. Em nossas buscas, nós não encontramos trabalhos que utilizaram o modelo da cuprizona e analisaram a expressão dos genes *Srgn*, *Slpr3*, *Serpina3n* e *Aldoc*. O que é interessante, pois em nossos dados é notável e intrigante a magnitude do aumento na expressão dos genes *Gfap* e *Serpina3n*, no córtex (**Figura 4**) e córtex pré-frontal (**Figura 4.1**), e *Lcn2*, *Slpr3* e *Serpina3n* no hipocampo (**Figura 4.2**), que se mostram muito mais expressos na condição cuprizona

(CUP) quando comparados com a condição controle (CTL). Entretanto, a expressão aumentada da proteína SERPINA3N no CPF de camundongos já foi documentada neste modelo (Oveland *et al.*, 2021). Juntos, esses dados corroboram com a reatividade astrocitária ocasionada pela cuprizona e agregam informações a respeito da especificidade da expressão gênica do perfil reativo destas células neste modelo.

Apesar do aumento expressivo dos marcadores da reatividade astrocitária no modelo da cuprizona, o tratamento com a clozapina não foi eficaz em diminuir a expressão desses marcadores gênicos nas três regiões avaliadas. Interessantemente, é possível observar uma tendência de aumento da expressão de GFAP, na região CA3 do hipocampo de animais expostos à cuprizona (CUP) quando comparados ao controle (VEI) (**Figura 5**) e uma tendência de diminuição da expressão de GFAP após o tratamento com clozapina (**Figura 5**). Este efeito na redução na expressão de GFAP no corpo caloso e córtex pré-frontal de camundongos expostos à cuprizona e tratados com clozapina (10mg/kg) já foi reportado (Chang *et al.*, 2019). Curiosamente, em nossas análises por RT-qPCR não houve redução na expressão gênica de *Gfap* no hipocampo, córtex e córtex pré-frontal dos camundongos.

A não efetividade de modulação da expressão destes genes após aplicação da clozapina pode ser devido a alguns fatores. Entre a 3^a e a 5^a semana de exposição à cuprizona, período este que iniciamos o tratamento com a clozapina, a reatividade astrocitária, ativação da microglia e lesão axonal aguda se tornam mais graves, e a desmielinização se torna visível por imuno-histoquímica (Zhan *et al.*, 2020; Sen *et al.*, 2022). O que corrobora o aumento na expressão dos genes marcadores da reatividade astrocitária na condição da cuprizona em nossas análises (**Figuras: 4, 4.1 e 4.2**). Entre a 3^a-5^a semana de exposição à neurotoxina, acontece também o início dos processos fagocíticos dos debris da bainha de mielina, realizado pelos astrócitos e microglia (Zhan *et al.*, 2020; Sen *et al.*, 2022). A desmielinização, juntamente com a reatividade astrocitária e microgliose, desencadeiam a ativação e recrutamento das células progenitoras de oligodendrócitos (OPCs) (Zhan *et al.*, 2020; Sen *et al.*, 2022). Portanto, a 3^a, 4^a e 5^a semana representam um período crítico no modelo da cuprizona. Sendo assim, nós hipotetizamos que a neurotoxicidade e neuroinflamação relacionada ao modelo cuprizona, foram acentuadas ao ponto da clozapina recuperar parcialmente os prejuízos da exposição a toxina, sendo suficiente para observarmos o efeito fisiológico da droga, mas não o suficiente para conseguirmos observar os efeitos na expressão gênica da reatividade de astrócitos.

Além disso, há evidências de que a redução da reatividade astrocitária se dá apenas após 6 semanas de interrupção da exposição dos animais à cuprizona (Praet *et al.*, 2014). É

importante notar também que os tratamentos com a clozapina foram realizados com uma única concentração (10mg/kg), porém há outras dosagens descritas na literatura (Templeton *et al.*, 2019), que seriam interessantes de serem comparadas nos experimentos. Com isso em vista, pode ser que a janela terapêutica escolhida para análise do efeito da clozapina, bem como a dosagem escolhida neste trabalho, não tenham possibilitado a visualização do efeito significativo da droga na redução da expressão dos genes marcadores do perfil reativo de astrócitos no modelo.

Cabe citar que há também outros marcadores importantes para avaliar a reatividade astrocitária que podem ter sido modulados pelo tratamento com clozapina, mas não conseguimos avaliar neste trabalho. Como por exemplo: o membro 1 da família de aldeído desidrogenase L1 (ALDH1L1), a proteína de filamento intermediário Vimentina e a proteína translocadora TSPO (Nack *et al.*, 2019; Zhan *et al.*, 2020; de los Angeles Castillo-Rodriguez *et al.*, 2022).

Por fim, há ainda a possibilidade do principal mecanismo protetor da clozapina não ser realmente em relação à neuroinflamação mediada pela reatividade astrocitária. Porém, mais estudos são necessários para confrontar essa hipótese. A partir desta constatação, decidimos avaliar o proteoma das regiões córtex e hipocampo para investigar as alterações moleculares que a clozapina exerce no modelo da cuprizona e elucidar os possíveis mecanismos moleculares que possam ter relação com eficácia clínica deste antipsicótico.

7.2| Alterações proteômicas no córtex e hipocampo após exposição à cuprizona

7.2.1| Alterações em proteínas da via de glioblastoma e oligodendrócitos

Nossos resultados demonstram que após a exposição à cuprizona, houve uma redução em todas as proteínas da via de glioblastoma e oligodendrócitos (**Figura 7.1**). É interessante notar que a redução na expressão da proteína básica da mielina (MBP) e da glicoproteína da mielina de oligodendrócitos (MOG), no córtex, da proteína proteolípica (PLP) no hipocampo e receptor alfa do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFRa) em ambos, condizem com a desmielinização ocasionada pela cuprizona, visto que são proteínas componentes estruturais da bainha de mielina e um marcador de células progenitoras de oligodendrócitos (OPCs) (Baumann and Pham-Dinh, 2001), que são relatadas como menos expressas neste modelo (Zhan *et al.*, 2020; Danesh-Seta *et al.*, 2021; Zirngibl *et al.*, 2022). Além disso, esse dado corrobora molecularmente com as observações de que a desmielinização é diferente entre as regiões córtex e hipocampo, no modelo da cuprizona.

7.2.2| Alterações em proteínas da via de astrocitoma e sinalizações por glutamato

Na via de astrocitoma houve uma redução na expressão de 11 das 13 proteínas envolvidas na via (**Figura 7.2**) e em 7 das 8 proteínas da via de sinalização por glutamato (**Figura 7.3**). É interessante notar que a proteína GFAP, na via de astrocitoma, mostrou um aumento de expressão apenas no hipocampo (**Figura 7.1**), mas em nossos dados de expressão gênica o gene *Gfap* aparece com a expressão aumentada em todas as regiões que analisamos (**Figuras 4, 4.1 e 4.2**). Curiosamente, em nossas análises qualitativas de imunofluorescência, também parece haver um aumento na expressão de GFAP na sub-região CA3 do hipocampo (**Figura 5**) e esse dado vai de encontro a este achado da proteômica indicando uma reatividade dos astrócitos no hipocampo

Ainda na via de astrocitoma, a proteína glutamina sintetase (GLUL/GS) mostrou uma expressão reduzida em ambas as regiões, córtex e hipocampo (**Figura 7.2**) e na via de sinalização glutamatérgica há a glutaminase (GLS) com sua expressão reduzida no córtex (**Figura 7.3**). A GS é responsável por catalisar a síntese de glutamina a partir de glutamato e amônia, enquanto que a GLS é responsável por catalisar a conversão da glutamina em glutamato e amônia (Bak, Schousboe and Waagepetersen, 2006; Eid *et al.*, 2016). Ambas são essenciais para o ciclo glutamato-glutamina, orquestrado por astrócitos e fundamental para a neurotransmissão glutamatérgica (Andersen, Schousboe and Verkhratsky, 2022).

A desregulação destas proteínas, junto às perturbações no ciclo glutamato-glutamina podem apontar para a excitotoxicidade do glutamato, já documentada no modelo da cuprizona e doenças neurodegenerativas (Azami *et al.*, 2013; Klauser *et al.*, 2018). Seguindo essa linha de pensamento, em nossos dados de expressão gênica confirmamos que há um aumento da expressão do transportador de glutamato *Eaat1* no córtex e hipocampo dos animais após a exposição à cuprizona (**Figuras 4 e 4.2**). De forma interessante, o aumento na expressão de EAAT1 em astrócitos do corpo caloso e córtex de camundongos já foi documentada neste modelo. Além disso, as evidências sugerem que a adaptação do tecido cerebral por meio do aumento na expressão de EAAT1 é eficaz para lidar com a toxicidade do glutamato durante as semanas de exposição à cuprizona (Hamby and Sofroniew, 2010; Peterson and Binder, 2020; An *et al.*, 2021). A redução na expressão da proteína superóxido dismutase 2 (SOD2), no hipocampo, na via de astrocitoma (**Figura 7.2**), também aponta para desregulações no mecanismo antioxidante nesta região, visto que a SOD2 é uma enzima que desempenha um papel chave na contenção do estresse oxidativo (Flynn and Melov, 2013).

É interessante notar que a única proteína com a expressão aumentada na via de sinalização por glutamato foi a membro 4 da família 4 de transportadores de solutos (SLC4A4), no córtex (**Figura 7.3**). SLC4A4 é o principal transportador de bicarbonato expresso em astrócitos e principal regulador do pH intracelular, extracelular e sináptico, modulando assim a excitabilidade neuronal (Khakipoor *et al.*, 2019). O aumento de sua expressão pode indicar uma resposta aos distúrbios ácido/base extracelulares potencialmente ocasionados pela cuprizona. A proteína S100A11 também é uma das poucas proteínas que aparecem com a expressão aumentada na região do hipocampo, na via de astrocitoma (**Figura 7.2**), o que é curioso pois experimentos de co-immunoprecipitação já demonstraram que a proteína S100A11 é um dos alvos de ligação da proteína S100B, formando o heterocomplexo S100B-S100A11 (Deloulme *et al.*, 2000), e em nossas análises de expressão gênica o aumento na expressão de *S100b* após a exposição à cuprizona foi observado apenas no hipocampo dos animais (**Figura 4.3**). Juntos estes dados corroboram o que a literatura já vem demonstrando a respeito das alterações astrocitárias no modelo da cuprizona e fortalecem nossos achados, que tanto nas análises de expressão gênica por RT-qPCR quanto nas análises proteômica apontam para o mesmo direcionamento.

7.2.3| Alterações em proteínas da via de fosforilação oxidativa

Nós observamos que a cuprizona ocasionou a redução na maioria dos complexos da cadeia respiratória e proteínas envolvidas na glicólise no córtex e hipocampo dos camundongos (**Figura 7.5**). As perturbações na mitocôndria e disfunções no metabolismo energético são amplamente associadas ao mecanismo de neurotoxicidade da cuprizona (Xuan *et al.*, 2015; Faizi *et al.*, 2016; Varhaug *et al.*, 2020). A diminuição da expressão de enzimas mitocondriais contendo cobre em sua estrutura ou como cofator, como a citocromo c oxidase (complexo IV), responsável por realizar a aceitação final de elétrons na cadeia de transporte de elétrons, já foi observada em camundongos expostos a esta neurotoxina (Gudi *et al.*, 2014). Entretanto, curiosamente em nossos dados a subunidade 4 da citocromo c oxidase isoforma 1 (COX4I1) se mostrou com a expressão aumentada no hipocampo (**Figura 7.5**).

A redução na expressão do complexo I (NADH desidrogenase) da cadeia respiratória em culturas de oligodendrócitos tratadas com cuprizona, bem como em mitocôndrias isoladas de camundongos exposto à neurotoxina também já foi observada (Pasquini *et al.*, 2007). Em nossas análises nós observamos que a maioria das subunidades complexo I estão com a expressão reduzida, com exceção das subunidades 11 e 6 do subcomplexo alfa (NDUFA11) e (NDUFA6), que se mostram com a expressão aumentada no hipocampo (**Figura 7.5**).

Nossos dados também mostram uma redução em componentes do complexo III da cadeia respiratória (redutase de ubiquinol-citocromo c), como na subunidade 7 (UCRB) e subunidade 5 (UQCRFS1) (**Figura 7.5**) e com relação à via glicolítica, também há a redução na expressão de proteínas chaves como aldolase C (ALDOC) e enolase (ENO1, ENO2, ENO3) no hipocampo e dihydrolipoamide S-acetyltransferase (DLAT) no córtex e hipocampo (**Figura 7.5**). Curiosamente, em nossos dados de expressão gênica há um aumento na expressão de *Aldoc* no córtex, córtex pré-frontal e hipocampo dos animais. Esses resultados confirmam que nossos achados estão consonantes com a literatura e que a cuprizona de fato interfere na função mitocondrial, afetando diversas proteínas envolvidas no metabolismo energético das diferentes regiões cerebrais *in vivo*.

Entretanto, há algumas observações em nossos dados de proteômica que apontam para o aumento da expressão de algumas subunidades de proteínas da via de oxidação fosforilativa. Estas contradições, podem ser explicadas pelo fato das nossas análises terem sido realizadas após a 5ª semana de exposição à neurotoxina, período crítico onde a perda de oligodendrócitos e desmielinização são severos (Zhan *et al.*, 2020). Talvez estes achados apontem para um mecanismo compensatório em neurônios que estão passando pela perda de suporte energético fornecido pelos oligodendrócitos. Além disso, há relatos na literatura de que a lesão axonal em modelos *in vivo* da esclerose múltipla é seguida por uma resposta compensatória, onde o conteúdo e a atividade mitocondrial aumentam nos axônios desmielinizados para compensar a desmielinização e promover a neuroproteção (Licht-Mayer *et al.*, 2020). Por outro lado, o aumento de expressão de apenas algumas subunidades dos complexos pode perturbar o equilíbrio da proporção entre os componentes, e acabar colaborando para a inibição da eficiência dos mesmos.

7.3| Alterações em proteínas do córtex e hipocampo após o tratamento com a clozapina

7.3.1| Alterações em proteínas da via de fosforilação oxidativa

O tratamento com a clozapina (grupo CUP+CLZ) reverteu a expressão da maioria das proteínas da via de fosforilação oxidativa e cadeia transportadora de elétrons quando comparada a regulação da mesma via após exposição à cuprizona (**Figuras 8.1 e 7.5** respectivamente). Apesar da clozapina não modular exatamente as mesmas proteínas que foram moduladas pela cuprizona, observa-se algumas semelhanças de modulação, como por exemplo as subunidades 7 (UCRB) e 5 (UQCRFS1) do complexo III, que estavam com a expressão reduzida após a exposição à cuprizona e aparecem com a expressão aumentada

após o tratamento com a clozapina. Também há de se observar que algumas proteínas que foram moduladas pela cuprizona, deixaram de aparecer nos dados de modulação pela clozapina, o que possivelmente indica um retorno ao estado basal de expressão após o tratamento.

Também houve diferença na direção de regulação das proteínas entre as duas regiões, como por exemplo, as subunidades da citocromo c oxidase (Complexo IV) COX4IL1, COX5A, COX6A1, COX6B1 e COX1A2, com a expressão aumentada no córtex e reduzida no hipocampo (**Figura 8.1**). Além disso, a clozapina reverteu a redução da expressão da subunidade 4 da isoforma 1 do complexo IV (COX4IL1) no hipocampo, que estava com a expressão aumentada após a exposição à cuprizona (**Figura 7.5**) e diminuiu após o tratamento com a clozapina (**Figura 8.1**).

Nossos achados parecem apontar para um aumento da eficiência do metabolismo energético no córtex dos animais, visto que a maioria das proteínas que tiveram a expressão aumentada pela clozapina estavam localizadas nessa região (**Figura 8.1**). Já existem relatos na literatura sobre a modulação de proteínas envolvidas na respiração mitocondrial e metabolismo energético pela clozapina e outros antipsicóticos (Ji *et al.*, 2009; Tran *et al.*, 2018; Cikánková *et al.*, 2019; Amiri *et al.*, 2021; Panizzutti *et al.*, 2023). A clozapina parece melhorar a captação de glicose e aumentar a eficácia da fosforilação oxidativa em oligodendrócitos *in vitro* e esse aumento de eficiência parece estar relacionado com a síntese de mielina (Steiner *et al.*, 2014). Dada a reversão dos prejuízos de memória e interação social que observamos nos testes comportamentais dos animais após o tratamento, é plausível supor que a clozapina esteja potencializando a eficiência bioenergética dos oligodendrócitos, resultando em remielinização e melhora da conectividade neuronal. A reversão de disfunções mitocondriais e comportamentais após o tratamento com a clozapina já foi observada em modelos animais de esquizofrenia (Tran *et al.*, 2018; Amiri *et al.*, 2021). Por outro lado, o aumento na expressão das proteínas relacionadas ao metabolismo energético não necessariamente está relacionado ao aumento da eficiência bioenergética das células. Portanto, mais estudos seriam necessários para confirmar tal correlação.

7.3.2| Alterações em proteínas da via autofágica

A via autofágica foi uma das vias enriquecidas em nossos dados após o tratamento dos animais com a clozapina (**Figura 8.3**). A autofagia é um processo de degradação e reciclagem de componentes intracelular, responsável por remover proteínas e/ou organelas envelhecidas ou danificadas devido a erros de dobramento. Basicamente, esse processo se dá

a partir da formação de autofagossomos, estruturas de dupla membrana que envolve parte do citoplasma, organelas e proteínas que precisam ser degradadas formando uma vesícula selada de dupla membrana (Hollenstein and Kraft, 2020; Cao *et al.*, 2021). Os autofagossomos se fundem com os lisossomos, formando os autofagolisossomos, que leva à degradação e/ou reciclagem da carga envolvida (Hollenstein and Kraft, 2020). Este processo é essencial para manter a homeostase celular e a renovação das organelas, e tem sido associado a doenças neurodegenerativas, câncer, doenças metabólicas e doenças psiquiátricas (Gassen and Rein, 2019; Yang and Xu, 2020).

A autofagia e suas formas seletivas (mitofagia e ferritinofagia) já foram reportadas em modelo animal com a cuprizona, sendo que a clozapina e haloperidol foram capazes de inibir a autofagia, prevenir a desmielinização, induzir a remielinização e reverter os déficits comportamentais induzidos pela cuprizona (Patergnani *et al.* 2021). A clozapina e o haloperidol também foram capazes de bloquear a formação de autofagolisossomos em neurônios primários de rato (Park *et al.* 2012). Em contrapartida, a clozapina induziu a autofagia por meio da via de sinalização AMPK-ULK1-Beclin1 no córtex frontal de rato (Kim *et al.* 2018).

Além disso, a clozapina foi capaz de limpar proteínas agregadas e aumentar a expressão de ATG8/LC3, proteínas da família da autofagia em *C. elegans* (Hao *et al.* 2017). O metabólito N-Óxido da clozapina (CNO) também foi capaz de reverter a ativação de autolisossomos e ferritinofagia em camundongos expostos a um modelo de doença de Parkinson (Sun *et al.*, 2024). Ademais, a clozapina protegeu células-tronco neurais humanas da morte celular induzida por cetamina em correlação com a diminuição da apoptose e autofagia, em modelo celular (Lundberg *et al.* 2020). Por fim, a autofagia microglial parece estar envolvida no refinamento sináptico e na regulação do neurocomportamento (Kim *et al.*, 2017).

Uma das proteínas alteradas nessa via pela clozapina em nossos experimentos, foi a BCL2L1, encontrada com a sua expressão reduzida no hipocampo (**Figura 8.3**). As proteínas da família BCL2 são proteínas antiapoptóticas capazes de controlar tanto a apoptose mitocondrial quanto inibir a autofagia (Patingre *et al.*, 2005). Já foi demonstrado que a BCL2L1 foi capaz de suprimir a mitofagia através da inibição da PGAM5, uma fosfatase localizada na mitocôndria, e também através da inibição da formação do autofagossomo (Patingre *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2014).

Recentemente, a autofagia como um mecanismo de ação da clozapina tem sido amplamente estudada, porém os dados ainda são elusivos. São escassos os trabalhos que

buscam entender a modulação da proteína BLC2L1 pela clozapina, demonstrando que o aprofundamento nesta via e proteína são um campo promissor de estudo para compreender melhor o mecanismo de ação e eficácia clínica deste antipsicótico.

7.3.3| Alterações em proteínas da via de ferroptose

Em nossos achados, a via da ferroptose foi enriquecida nas análises do hipocampo e, principalmente, do córtex dos camundongos após o tratamento com a clozapina (**Figura 8**). Apesar de na literatura já haver evidências de que a perda de oligodendrócitos e a desmielinização ocasionada pela cuprizona no corpo caloso é mediada pela ferroptose (Jhelum *et al.*, 2020), é interessante notar que em nossos dados proteômicos da condição cuprizona apenas, essa via e suas proteínas não aparecem alteradas. O enriquecimento da via da ferroptose, bem como das proteínas citadas nessa seção, se deu apenas após o tratamento com a clozapina.

Dentre as proteínas alteradas pela clozapina dentro desta via, nos chamou a atenção a proteína ligante de poli(rC) 1 (PCBP1) e 2 (PCBP2), com a expressão reduzida no córtex (**Figura 8.2**). Além disso, a proteína membro 2 da família 3 de transportadores de solutos (SLC3A2), única proteína da via regulada em comum no córtex e hipocampo, com a expressão aumentada (**Figura 8.2**). Nós somos os primeiros a relatar a modulação de expressão das proteínas PCBP1, PCBP2 e SLC3A2 pela clozapina.

A ferroptose é um tipo de morte celular programada, conceituado em 2012 por Dixon, S. J. *et al* como um novo modo de morte celular não apoptótica, dependente de ferro, e caracterizado pelo acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs) e peroxidação lipídica (Dixon *et al.*, 2012). A morte celular por ferroptose difere da necrose, apoptose e autofagia em morfologia e função celular e tem chamado atenção por desempenhar um papel regulatório importante na ocorrência e desenvolvimento de condições patológicas como doenças inflamatórias, câncer e doenças neurodegenerativas (Xie *et al.*, 2016; Su *et al.*, 2019; Yan *et al.*, 2021). Morfológicamente, a ferroptose parece afetar principalmente as mitocôndrias, onde observa-se a redução do volume mitocondrial, aumento da densidade da bicamada lipídica interna e redução ou desaparecimento das cristas mitocondriais, porém a membrana celular permanece intacta, o núcleo mantém o tamanho normal e não há concentração de cromatina (Dixon *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2020).

Bioquimicamente, há três fatores principais que estão envolvidos na morte celular por ferroptose: o aumento do ferro livre intracelular, o esgotamento da glutathiona (GSH) /glutathiona peroxidase 4 (GPX4) /sistema do eixo-Xc e a oxidação de ácidos graxos

poli-insaturados (PUFAs) da membrana (Jiang, Stockwell and Conrad, 2021). Basicamente, as EROs reagem com os fosfolípidios insaturados nas membranas lipídicas, levando à peroxidação de lípidios. O acúmulo de ferro livre (Fe^{2+}) na célula reage com peróxidos lipídicos gerando o radical hidroxila ($\bullet OH$), que é uma espécie altamente reativa de oxigênio. Esse ciclo contínuo de peroxidação lipídica e formação de EROs leva ao estresse oxidativo e danos fatais nas proteínas, ácidos nucleicos e lípidios, resultando em última instância na morte celular por ferroptose. Além disso, prejuízos na concentração intracelular de glutathiona (GSH) e diminuição da atividade da glutathiona peroxidase 4 (GPX4) fazem com que os peróxidos lipídicos deixem de ser metabolizados pela reação de redução catalisada pela GPX4, resultando no aumento significativo de EROS que promovem a ferroptose (Yang and Stockwell, 2008; Su *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2020; Jiang, Stockwell and Conrad, 2021; Yan *et al.*, 2021).

As proteínas de ligação ao poli(C) (PCBPs) são comumente proteínas ligantes ao RNA que interagem de maneira específica com sequências de poli-cisteína (Choi *et al.*, 2009). Recentemente também têm sido reconhecidas como chaperonas citosólicas de Fe (II) (Yan *et al.*, 2021). Estudos já demonstraram que as proteínas PCBP1 e PCBP2 compõem a via da ferroptose, sendo responsáveis por mediar o armazenamento e transporte de ferro entre a proteína ferritina e citosol mitocondrial, e portanto, relacionadas com o acúmulo de ferro livre observado no processo de ferroptose (Ryu *et al.*, 2017; Yan *et al.*, 2021).

Sugere-se também que a PCBP1 desempenha um papel importante na resposta imune inata mediada pela sintetase de GMP-AMPc (cGAS) (Liao, Lei and Shu, 2021). A expressão aumentada da proteína PCBP2 foi observada em pacientes com glioma e já foi demonstrado que esta proteína é capaz de modular a progressão e desenvolvimento deste tipo de tumor (Mao *et al.*, 2020; Chen *et al.*, 2022). Entretanto, a redução da expressão de PCBP2 aumentou significativamente a sensibilidade das células de mesotelioma maligno à ferroptose (Yue *et al.*, 2022). Ademais, a PCBP2 parece desempenhar um papel importante também na apoptose neuronal e na proliferação de astrócitos (Mao *et al.*, 2016).

Em nossos achados, a proteína membro 2 da família 3 de transportadores de solutos (SLC3A2), foi a única proteína da via de ferroptose regulada em comum no córtex e hipocampo, com a expressão aumentada (**Figura 8.2**). A SLC3A2 é uma sub-unidade da glicoproteína transmembranar CD98 (Vection, O'Callaghan and Keriel, 2022) e compõe também o sistema transportador de cistina/glutamato Xc-, crucial no metabolismo do glutamato (Koppula, Zhuang and Gan, 2021). A diminuição da expressão de SLC3A2 e GPX4 é um fator que promove a ferroptose no contexto da esquizofrenia (Zhang *et al.*, 2024).

Em contrapartida, o restabelecimento da expressão de GPX4 e SLC3A2 parece reverter a promoção de ferroptose no contexto deste transtorno (Zhang *et al.*, 2024).

A inibição da expressão do fator de transcrição e ativador de sinal 3 (STAT3) pelo antibiótico tiostreptona induziu a ferroptose através da via STAT3/GPX4, demonstrando que o fator de transcrição STAT3 liga-se à região promotora do GPX4 para promover sua transcrição (Zhang *et al.*, 2022). Além disso, estudos anteriores indicaram que a redução de GSH pode dificultar a ativação do fator de transcrição STAT3 *in vitro* (Liang *et al.*, 2018). Demonstra-se na literatura também, que a proteína SLC3A2 parece mediar a síntese de GSH, potencialmente facilitando a ativação de *Stat3* e consequentemente promovendo a transcrição de GPX4 (Zhang *et al.*, 2024). É importante citar que a modulação de *Stat3* e da via JAK-STAT pela clozapina já foi descrita por (Singh *et al.*, 2009). Interessantemente, além do aumento na expressão da proteína SLC3A2 em nossos dados proteômicos, em nossos dados de expressão gênica, a expressão de *Stat3* se mostra aumentada no córtex apenas na condição de tratamento com a clozapina (**Figura 4**).

Ademais, investigações mecanísticas revelaram que o metabólito N-Óxido da clozapina (CNO) foi capaz de suprimir a ferroptose em um modelo animal de doença de Parkinson ao corrigir desequilíbrios de ferro, reduzir a peroxidação lipídica e mitigar alterações morfológicas mitocondriais em neurônios dopaminérgicos (Sun *et al.*, 2024). Além disso, a literatura descreve que a clozapina exerce atividade antioxidante através da modulação da superóxido dismutase, glutatona (GSH) e redução da peroxidação lipídica (Dalla *et al.*, 1998; Caruso *et al.*, 2020)

Cabe também citar que observações clínicas demonstraram que os níveis séricos de GPX4 e SLC3A2 estavam diminuídos em pacientes com esquizofrenia (Zhang *et al.*, 2024) e em nossos dados a clozapina aumentou a expressão de SLC3A2 no córtex e hipocampo de camundongos. Além disso, a clozapina também parece ser capaz de modular a expressão de *Stat3*, que juntamente com SLC3A2 parece regular a expressão de GPX4, um antioxidante crucial para atenuar a morte celular por ferroptose (Zhang *et al.*, 2024).

Nós somos os primeiros a descrever a modulação das proteínas PCBP1, PCBP2 e SLC3A2 pela clozapina na via da ferroptose, e juntos, estes dados lançam alguma luz sobre um potencial novo mecanismo de ação deste fármaco, que talvez explique sua eficiência clínica única no contexto de tratamento da esquizofrenia. Entretanto, o mecanismo preciso por trás desse fenômeno requer maior elucidação por meio de investigações mecanísticas.

7.3.4| Alterações em proteínas da via do sistema endocanabinóide

As alterações pela clozapina na via do sistema endocanabinóide ocorreram apenas no córtex dos animais (**Figura 8.4**). Apesar de quase todas as proteínas descritas não serem diretamente parte do sistema endocanabinóide, nos chamou a atenção a modulação da enzima de degradação amido hidrolase de ácido graxo (FAAH), que teve sua expressão aumentada pela clozapina e a modulação positiva de subunidades da proteína G.

O sistema endocanabinóide consiste em uma rede de sinalização lipídica que desempenha funções regulatórias em diversos processos fisiológicos do sistema nervoso central, incluindo aprendizado, memória, processamento emocional, bem como controle da dor, resposta inflamatória e imunológica (Mangiatordi *et al.*, 2023; Machado *et al.*, 2024). Seus principais mensageiros endógenos são a anandamida (AEA) e o 2-araquidonilglicerol (2-AG), sintetizados sob demanda em neurônios pós-sinápticos que, uma vez liberados, atuam como mensageiros retrógrados, ligando-se aos receptores canabinoides acoplados à proteína G, CB1 e CB2, nos neurônios pré-sinápticos (Seabra *et al.*, 2018). Após serem removidos das sinapses por transportadores nas membranas neuronais, a anandamida é hidrolisada pela FAAH ou pela N-aciletanolamina-hidrolisante amida ácida (NAAA) nos neurônios (Seabra *et al.*, 2018). O sistema endocanabinoide está fortemente envolvido em distúrbios neuropsiquiátricos e neurodegenerativos e a FAAH é uma enzima que contribui diretamente para a regulação dos níveis de endocanabinoides no organismo (Zajicek, 2011; Kucerova *et al.*, 2014).

Evidências de estudos pré-clínicos mostram que os canabinoides podem limitar o processo de desmielinização, promover a remielinização e ter propriedades anti-inflamatórias, reduzindo a infiltração de células imunes no sistema nervoso central em camundongos modelo da esclerose múltipla (Sirbu *et al.*, 2023). Em nossos achados, a regulação positiva das subunidades da proteína G, uma classe de proteínas de sinalização intracelular associadas a ativação do receptores de endocanabinoides (Wiley *et al.*, 2008), junto ao aumento das expressão de FAAH nos dão uma pista de que a clozapina talvez esteja ativando as sinalizações e regulações do sistema endocanabinoide no córtex dos animais. Além disso, já foi demonstrado que células precursoras de oligodendrócitos e oligodendrócitos maduros, tanto do córtex quanto da medula espinhal, expressam níveis altos de FAAH, que aumentam com a maturação (Moreno-Luna *et al.*, 2021). Sendo assim, é razoável supor que a possível modulação positiva da via de sinalização do sistema

endocanabinóide possa estar relacionada à melhora das disfunções comportamentais que observamos nos animais expostos à cuprizona.

Embora pareça ser importante para o mecanismo de ação dos antipsicóticos, há uma escassez de estudos publicados que investiguem mecanística e sistemicamente as ações modulatórias da clozapina sobre a enzima FAAH. Isso ressalta que a interação entre a clozapina e enzimas de degradação do sistema endocanabinoide é um campo promissor de estudo para melhor compreender o mecanismo de ação desse fármaco.

7.4| Alterações comportamentais após exposição à cuprizona e tratamento com a clozapina

Nossos resultados demonstraram que os camundongos C57BL/6 submetidos a uma dieta contendo 0,2% de cuprizona, apresentaram após 5 semanas de exposição à neurotoxina prejuízos significativos em relação a memória de curta e longa duração (**Figura 3.2**) e interação social (**Figura 3.3**), além de também apresentarem uma diminuição no tempo de permanência no centro da arena, número de entradas e na distância percorrida no centro da arena, além de uma diminuição no número de entradas na periferia (**Figura 3.1**), que pode indicar um comportamento associado à ansiedade. Estudos prévios já demonstraram que a cuprizona é capaz de alterar a atividade locomotora dos animais e induzir comportamentos relacionados à ansiedade (Franco-Pons *et al.*, 2007; Torkildsen *et al.*, 2008).

O tratamento com clozapina foi capaz de reverter os prejuízos comportamentais desencadeados pela exposição à cuprizona. A **Figura 3.4** nos mostra que não houve diferença significativa na locomoção dos animais após o tratamento com a clozapina (CLZ; CUP+CLZ) quando comparados com o controle (CTL). O tratamento com a clozapina também foi capaz de reverter os déficits na memória de curta e longa duração, (**Figura 3.5-A e B**) e de interação social (**Figura 3.6**) ocasionados pela cuprizona. Nossos dados estão condizentes com a literatura, visto que são bem documentadas as alterações comportamentais observadas no modelo da cuprizona (Franco-Pons *et al.*, 2007). Ademais, há evidências de que a clozapina é capaz de melhorar os déficits de interação social observados neste modelo (Xu *et al.*, 2010).

Em relação aos prejuízos relacionados à memória observados nos animais após a exposição à cuprizona, nossos dados mostram que o modelo ocasionou a desmielinização do hipocampo dos camundongos após 5 semanas de exposição à neurotoxina (**Figura 3.3**). Esse dado também vai de encontro à literatura, visto que é bem estabelecido que a cuprizona é

capaz de desmielinizar o hipocampo e com isso acarretar danos de aprendizado e memória (Cui *et.al.*, 2018).

No que tange a memória episódica, avaliada neste trabalho através do teste de reconhecimento de objetos, esta refere-se a memórias de experiências cotidianas, que envolvem a codificação de uma representação dinâmica dos objetos presentes e suas características contextuais (Danieli, Guyon and Bethus, 2023). A codificação da memória episódica começa com a percepção sensorial do episódio (neste contexto, o objeto ofertado ao camundongo), seguida pelo processamento em áreas corticais no lobo temporal, onde são produzidas representações multimodais dos objetos (no córtex perirrinal) e das características espaciais e contextuais (na região parahipocampal). Os dados são então encaminhados através do córtex entorrinal para a formação hipocampal, onde são integrados. Por fim, o padrão neural codificado é transmitido de volta ao neocórtex para sua consolidação (Danieli, Guyon and Bethus, 2023). O comprometimento da memória episódica é um sintoma cognitivo debilitante e a recuperação dos prejuízos observados e medidos no teste de reconhecimento de objetos transcende a região do hipocampo, visto que há o envolvimento das vias corticais na formação e consolidação deste tipo de memória e é sabido que a cuprizona ocasiona a desmielinização em diversas regiões cerebrais, mesmo que em diferentes intensidades (Gudi *et al.*, 2009).

Nós observamos o aumento da expressão da maioria dos genes relacionados ao perfil reativo dos astrócitos no córtex e córtex pré-frontal (**Figuras 4 e 4.1** respectivamente), bem como o aumento na expressão de todos estes na região do hipocampo (**Figura 4.2**), após a exposição à cuprizona. Esses dados consolidam molecularmente, que possivelmente os prejuízos na memória episódica, observados nos animais, não estão relacionados apenas ao advento da desmielinização já consolidada neste modelo, mas também ao ambiente pró-inflamatório que a cuprizona desencadeia no SNC.

Curiosamente, Le Cozannet *et. al.* relataram que a clozapina não foi capaz de reverter os prejuízos relacionados à memória episódica em um modelo animal de esquizofrenia com o composto fenciclidina (Le Cozannet, Fone and Moran, 2010). Entretanto, em nossos dados fica claro que a clozapina foi capaz de reverter o comprometimento da memória episódica ocasionada pela cuprizona. Porém, a mesma não foi capaz de diminuir a expressão dos genes relacionados ao perfil reativo dos astrócitos no córtex, córtex pré-frontal e hipocampo (**Figuras 4; 4.1 e 4.2**).

A literatura tem demonstrado que os astrócitos desempenham um papel crucial na remoção da mielina danificada no modelo da cuprizona (Skripuletz *et al.*, 2013; Sen *et al.*,

2022). Falhas nos processos fagocíticos da mielina e o consequente excesso de debris de mielina impede o recrutamento, proliferação e maturação das células progenitoras de oligodendrócitos, o que prejudica a remielinização dos axônios de neurônios (Sen *et al.*, 2022). Além de desempenharem um papel importante no processo fagocítico dos debris de mielina, os astrócitos reativos também são importantes no recrutamento da micróglia para o local de desmielinização e este recrutamento no modelo da cuprizona está relacionado a uma aceleração da remielinização (Sen *et al.*, 2022). Por outro lado, a ativação ou recrutamento inadequado das microglias para o local de desmielinização, e a produção de mediadores tóxicos, prejudica a remielinização resultando em desmielinização progressiva (Sen *et al.*, 2022).

Interessantemente, a modulação de astrócitos pela clozapina também tem sido evidenciada em pesquisas recentes. Em astrócitos derivados de iPSCs vindas de pacientes com esquizofrenia, a clozapina foi capaz de resgatar a deficiência de glutamato e d-serina observadas nos astrócitos em cultura antes do tratamento (Akkouh *et al.*, 2022). A modulação da liberação de d-serina e L-glutamato pela clozapina também já foi observada no córtex frontal de ratos e em astrócitos primários (Tanahashi *et al.*, 2012), bem como a modulação das subunidades do receptor NMDA em linhagem de astrócitos (Martins-de-Souza, Lebar and Turck, 2011). Estes dados não só fornecem evidências de que a clozapina atua em astrócitos, como reforça que a d-serina em particular, e a neurotransmissão glutamatérgica mediada pelo receptor NMDA em geral, podem desempenhar um papel importante na fisiopatologia deste transtorno e no mecanismo de ação deste fármaco.

Estes dados evidenciam que há a participação dos astrócitos na recuperação dos prejuízos desencadeados pela cuprizona e que a clozapina é capaz de modular este tipo celular. Porém, apesar das propriedades anti-inflamatórias e imunomoduladoras da clozapina, inclusive através da regulação da reatividade astrocitária e ativação microglial já terem sido relatadas no modelo da cuprizona e correlacionadas com a melhora de prejuízos comportamentais dos camundongos (Chang *et al.*, 2019; Templeton *et al.*, 2019; Stamoula *et al.*, 2022), os nossos dados nos mostram que talvez não seja por esta via molecular que a clozapina atuou na reversão dos prejuízos comportamentais observados no modelo da cuprizona executado nesta dissertação.

Nós apontamos para algumas vias que podem estar relacionadas ao mecanismo de ação e eficácia da clozapina, que seriam interessantes de serem futuramente aprofundadas. Os marcadores de autofagia e mitofagia, por exemplo, já foram encontrados aumentados nos biofluidos de pacientes com esclerose múltipla e o aumento no fluxo autofágico e mitofagia

reportados no modelo da cuprizona. A inibição dessas vias pela clozapina foi capaz de atenuar os prejuízos comportamentais dos animais neste modelo (Patergnani *et al.*, 2021). Em nossos dados a modulação da via autofágica pela clozapina foi significativamente alterada e este achado vai de encontro ao que a literatura atual tem produzido, confirmando portanto, que a modulação das vias autofágicas talvez estejam relacionadas à melhora dos prejuízos cognitivos e sociais que observamos em nossos experimentos. Ademais, essas vias são promissoras para o entendimento profundo do mecanismo de ação deste fármaco e suas aplicações, tanto para o tratamento da esquizofrenia, quanto como uma possível ferramenta terapêutica no contexto da esclerose múltipla.

Além disso, apontamos também para a via da ferroptose, onde reportamos a modulação de proteínas importantes pela clozapina, que até onde sabemos, não haviam sido reportadas na literatura até então. A cuprizona diminui a atividade de enzimas cuprílicas, como superóxido dismutase 1 e citocromo oxidase, causando estresse oxidativo. Sendo este um dos mecanismos associados à morte oligodendrócitos e desmielinização no SNC (Xu *et al.*, 2010; Jhelum *et al.*, 2020). Na literatura, demonstra-se que a clozapina atua como um antioxidante eficaz na peroxidação lipídica produzida nas membranas microssomais (Dalla *et al.*, 1998; Caruso *et al.*, 2020). O estresse oxidativo advindo do acúmulo de espécies reativas de oxigênio e peroxidação lipídica são um dos ativadores da via da ferroptose. Sendo assim, a modulação das proteínas desta via pela clozapina também podem ser um dos caminhos pelos quais observamos a melhora dos prejuízos cognitivos e sociais evidentes em nossos experimentos. Outrossim, também é um caminho promissor de estudo e aprofundamento no mecanismo de ação e eficácia clínica da clozapina.

8 | CONCLUSÃO

Nós concluímos que a cuprizona gera prejuízos significativos na memória de curta e longa duração e interação social dos animais, além de aumentar significativamente a expressão da maioria dos genes relacionados ao perfil reativo dos astrócitos no córtex pré-frontal, córtex e hipocampo dos camundongos. O tratamento com a clozapina resultou na reversão dos prejuízos na memória de curta e longa duração e interação social ocasionados pela cuprizona nos animais, porém não foi capaz de reverter o aumento significativo na expressão dos genes relacionados à reatividade astrocitária, mesmo a análise qualitativa por imunofluorescência apontando para uma tendência na diminuição da expressão da proteína GFAP na sub-região CA3 do hipocampo dos animais. Por outro lado, nossas análises proteômicas mostraram que o tratamento com clozapina foi capaz de alterar significativamente a expressão de proteínas envolvidas em vias como fosforilação oxidativa, autofagia, ferroptose e sistema endocanabinóide no córtex e/ou hipocampo dos animais. Sendo assim, os resultados obtidos nesta dissertação nos dão uma pista sobre a possível ação modulatória que a clozapina exerce sobre a reatividade astrocitária e lançam alguma luz em proteínas e vias bioquímicas que auxiliam no entendimento dos mecanismos moleculares de sua ação e que possam também estar envolvidos com a efetividade clínica exclusiva deste fármaco.

9 | REFERÊNCIAS

- Ahmad, I. *et al.* (2023) ‘An Association of Chitinase-3 Like-Protein-1 With Neuronal Deterioration in Multiple Sclerosis’, *ASN neuro*, 15. Available at: <https://doi.org/10.1177/17590914231198980>.
- Akkouh, I.A. *et al.* (2022) ‘Derivation and Molecular Characterization of a Morphological Subpopulation of Human iPSC Astrocytes Reveal a Potential Role in Schizophrenia and Clozapine Response’, *Schizophrenia bulletin*, 48(1). Available at: <https://doi.org/10.1093/schbul/sbab092>.
- Amiri, S. *et al.* (2021) ‘Clozapine attenuates mitochondrial dysfunction, inflammatory gene expression, and behavioral abnormalities in an animal model of schizophrenia’, *Neuropharmacology*, 187. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2021.108503>.
- Anand, K.S. and Dhikav, V. (2012) ‘Hippocampus in health and disease: An overview’, *Annals of Indian Academy of Neurology*, 15(4), p. 239.
- Andersen, J.V., Schousboe, A. and Verkhratsky, A. (2022) ‘Astrocyte energy and neurotransmitter metabolism in Alzheimer’s disease: Integration of the glutamate/GABA-glutamine cycle’, *Progress in neurobiology*, 217. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2022.102331>.
- de los Angeles Castillo-Rodriguez, M. *et al.* (2022) ‘Astroglial and oligodendroglial markers in the cuprizone animal model for de- and remyelination’, *Histochemistry and cell biology*, 158(1), p. 15.
- An, J. *et al.* (2021) ‘Temporal and spatial evolution of various functional neurons during demyelination induced by cuprizone’, *Journal of neurophysiology*, 126(5), pp. 1756–1771.
- Araque, A. *et al.* (1999) ‘Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner’, *Trends in neurosciences*, 22(5), pp. 208–215.
- Aringhieri, S. *et al.* (2018) ‘Molecular targets of atypical antipsychotics: From mechanism of action to clinical differences’, *Pharmacology & therapeutics*, 192, pp. 20–41.
- Azami, T.A. *et al.* (2013) ‘Regional regulation of glutamate signaling during cuprizone-induced demyelination in the brain’, *Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger: official organ of the Anatomische Gesellschaft*, 195(5). Available at: <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2013.03.004>.
- Bak, L.K., Schousboe, A. and Waagepetersen, H.S. (2006) ‘The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer’, *Journal of neurochemistry*, 98(3), pp. 641–653.
- Bannerman, D.M. *et al.* (2014) ‘Hippocampal synaptic plasticity, spatial memory and anxiety’, *Nature reviews. Neuroscience*, 15(3), pp. 181–192.
- Baumann, N. and Pham-Dinh, D. (2001) ‘Biology of Oligodendrocyte and Myelin in the Mammalian Central Nervous System’, *Physiological reviews* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1152/physrev.2001.81.2.871>.

Beschorner, R. *et al.* (2007) 'Reactive astrocytes and activated microglial cells express EAAT1, but not EAAT2, reflecting a neuroprotective potential following ischaemia', *Histopathology*, 50(7). Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2007.02703.x>.

Bicks, L.K. *et al.* (2015) 'Prefrontal Cortex and Social Cognition in Mouse and Man', *Frontiers in psychology*, 6, p. 166005.

Blakemore, W.F. (1972) 'Observations on oligodendrocyte degeneration, the resolution of status spongiosus and remyelination in cuprizone intoxication in mice', *Journal of neurocytology*, 1(4), pp. 413–426.

Bonneh-Barkay, D. *et al.* (2010) 'In vivo CHI3L1 (YKL-40) expression in astrocytes in acute and chronic neurological diseases', *Journal of neuroinflammation*, 7. Available at: <https://doi.org/10.1186/1742-2094-7-34>.

Buschmann, J.P. *et al.* (2012) 'Inflammatory response and chemokine expression in the white matter corpus callosum and gray matter cortex region during cuprizone-induced demyelination', *Journal of molecular neuroscience: MN*, 48(1), pp. 66–76.

Cahoy, J.D. *et al.* (2008) 'A Transcriptome Database for Astrocytes, Neurons, and Oligodendrocytes: A New Resource for Understanding Brain Development and Function', *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 28(1), p. 264.

Cao, W. *et al.* (2021) 'An overview of autophagy: Mechanism, regulation and research progress', *Bulletin du cancer*, 108(3). Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bulcan.2020.11.004>.

Carlén, M. (2017) 'What constitutes the prefrontal cortex?', *Science* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.aan8868>.

Carlton, W.W. (1967) 'Studies on the induction of hydrocephalus and spongy degeneration by cuprizone feeding and attempts to antidote the toxicity', *Life sciences*, 6(1), pp. 11–19.

Carmona, E.T. *et al.* (2023) '396. Clozapine Demethylation and Astrocyte Activity in Treatment Resistant Schizophrenia: A Proton Magnetic Resonance Spectroscopy Study', *Biological psychiatry*, 93(9), pp. S254–S255.

Carregari, V.C. (2022) 'Protein Extraction and Sample Preparation Methods for Shotgun Proteomics with Central Nervous System Cells and Brain Tissue', *Advances in experimental medicine and biology*, 1382, pp. 1–15.

Caruso, G. *et al.* (2020) 'Antioxidant Properties of Second-Generation Antipsychotics: Focus on Microglia', *Pharmaceuticals*, 13(12). Available at: <https://doi.org/10.3390/ph13120457>.

Catts, V.S. *et al.* (2014) 'Increased expression of astrocyte markers in schizophrenia: Association with neuroinflammation', *The Australian and New Zealand journal of psychiatry*, 48(8), pp. 722–734.

Chang, H. *et al.* (2019) 'The antipsychotic-like effects of clozapine in C57BL/6 mice exposed to cuprizone: Decreased glial activation', *Behavioural brain research*, 364, pp. 157–161.

- Chen, X. *et al.* (2022) 'PCBP2 Reduced Oxidative Stress-Induced Apoptosis in Glioma through cGAS/STING Pathway by METTL3-Mediated m6A Modification', *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2022. Available at: <https://doi.org/10.1155/2022/9049571>.
- Choi, H.S. *et al.* (2009) 'Poly(C)-binding Proteins as Transcriptional Regulators of Gene Expression', *Biochemical and biophysical research communications*, 380(3), p. 431.
- Cikánková, T. *et al.* (2019) 'In vitro effects of antipsychotics on mitochondrial respiration', *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 392(10). Available at: <https://doi.org/10.1007/s00210-019-01665-8>.
- Correll, C.U. *et al.* (2022) 'Correction: A Guideline and Checklist for Initiating and Managing Clozapine Treatment in Patients with Treatment-Resistant Schizophrenia', *CNS drugs*, 36(9), p. 1015.
- Correll, C.U. and Howes, O.D. (2021) 'Treatment-Resistant Schizophrenia: Definition, Predictors, and Therapy Options', *The Journal of clinical psychiatry*, 82(5). Available at: <https://doi.org/10.4088/JCP.MY20096AH1C>.
- Cubas-Núñez, L. *et al.* (2021) 'Potential Role of CHI3L1+ Astrocytes in Progression in MS', *Neurology(R) neuroimmunology & neuroinflammation*, 8(3). Available at: <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000000972>.
- Cui, C. *et al.* (2018) 'The antibody rHlgM22 facilitates hippocampal remyelination and ameliorates memory deficits in the cuprizone mouse model of demyelination', *Brain Res*, 1694:73-86. Available at: doi: 10.1016/j.brainres.2018.05.013
- Dalla, L.A. *et al.* (1998) 'Antioxidant properties of clozapine and related neuroleptics', *Free radical research*, 29(2). Available at: <https://doi.org/10.1080/10715769800300171>.
- Danesh-Seta, T. *et al.* (2021) 'Bee Venom-Derived BBB Shuttle and its Correlation with Oligodendrocyte Proliferation Markers in Mice Model of Multiple Sclerosis', *Neurotoxicity research*, 39(4). Available at: <https://doi.org/10.1007/s12640-021-00361-x>.
- Danieli, K., Guyon, A. and Bethus, I. (2023) 'Episodic Memory formation: A review of complex Hippocampus input pathways', *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, 126. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2023.110757>.
- Gomes, F.V., Llorente R, Del Bel EA, Viveros MP, López-Gallardo M, Guimarães FS. (2015) 'Decreased glial reactivity could be involved in the antipsychotic-like effect of cannabidiol'. *Schizophrenia research*, 164(1-3), pp. 155–163. doi: 10.1016/j.schres.2015.01.015. Epub 2015 Feb 10. PMID: 25680767.
- Degl'Innocenti, E. and Dell'Anno, M.T. (2023) 'Human and mouse cortical astrocytes: a comparative view from development to morphological and functional characterization', *Frontiers in neuroanatomy*, 17, p. 1130729.
- Deloulme, J.C. *et al.* (2000) 'S100A6 and S100A11 Are Specific Targets of the Calcium- and Zinc-binding S100B Protein in Vivo *', *The Journal of biological chemistry*, 275(45), pp. 35302–35310.
- Dixon, S.J. *et al.* (2012) 'Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death',

Cell, 149(5). Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.042>.

Eid, T. *et al.* (2016) ‘The Glutamate-Glutamine Cycle in Epilepsy’, *Advances in neurobiology*, 13. Available at: https://doi.org/10.1007/978-3-319-45096-4_14.

Elbaz, E.M. *et al.* (2018) ‘Neuroprotective effect of linagliptin against cuprizone-induced demyelination and behavioural dysfunction in mice: A pivotal role of AMPK/SIRT1 and JAK2/STAT3/NF- κ B signalling pathway modulation’, *Toxicology and applied pharmacology*, 352. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.taap.2018.05.035>.

Eng, L.F. *et al.* (1971) ‘An acidic protein isolated from fibrous astrocytes’, *Brain research*, 28(2), pp. 351–354.

Escartin, C. *et al.* (2021) ‘Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions’, *Nature neuroscience*, 24(3), pp. 312–325.

Faizi, M. *et al.* (2016) ‘Toxicity of cuprizone a Cu(2+) chelating agent on isolated mouse brain mitochondria: a justification for demyelination and subsequent behavioral dysfunction’, *Toxicology mechanisms and methods*, 26(4). Available at: <https://doi.org/10.3109/15376516.2016.1172284>.

Falcone, C. *et al.* (2019) ‘Cortical interlaminar astrocytes across the thalian mammal radiation’, *The Journal of comparative neurology*, 527(10), pp. 1654–1674.

Falcone, C. *et al.* (2022) ‘Redefining varicose projection astrocytes in primates’, *Glia*, 70(1). Available at: <https://doi.org/10.1002/glia.24093>.

Fischbach, F. *et al.* (2019) ‘Cuprizone-induced graded oligodendrocyte vulnerability is regulated by the transcription factor DNA damage-inducible transcript 3’, *Glia*, 67(2), pp. 263–276.

Flynn, J.M. and Melov, S. (2013) ‘SOD2 in Mitochondrial Dysfunction and Neurodegeneration’, *Free radical biology & medicine*, 62. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.05.027>.

Food and Drug Administration Clozaril: Novartis Pharmaceuticals Corporation. [(accessed on 2 March 2024)];2010 Available online: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2010/019758s062lbl.pdf

Franco-Pons, N. *et al.* (2007) ‘Behavioral deficits in the cuprizone-induced murine model of demyelination/remyelination’, *Toxicology letters*, 169(3), pp. 205–213.

Gammon, D. *et al.* (2021) ‘Clozapine: Why Is It So Uniquely Effective in the Treatment of a Range of Neuropsychiatric Disorders?’, *Biomolecules*, 11(7). Available at: <https://doi.org/10.3390/biom11071030>.

Gassen, N.C. and Rein, T. (2019) ‘Is There a Role of Autophagy in Depression and Antidepressant Action?’, *Frontiers in psychiatry / Frontiers Research Foundation*, 10. Available at: <https://doi.org/10.3389/fpsy.2019.00337>.

Gomes, F.C.A., Tortelli, V.P. and Diniz, L. (2013) ‘Glia: dos velhos conceitos às novas funções de hoje e as que ainda virão’, *Estudos Avançados*, 27(77), pp. 61–84.

Gouvêa-Junqueira, D. *et al.* (2020) ‘Novel Treatment Strategies Targeting Myelin and Oligodendrocyte Dysfunction in Schizophrenia’, *Frontiers in psychiatry / Frontiers Research Foundation*, 11, p. 379.

Gudi, V. *et al.* (2009) ‘Regional differences between grey and white matter in cuprizone induced demyelination’, *Brain research*, 1283, pp. 127–138.

Gudi, V. *et al.* (2014) ‘Glial response during cuprizone-induced de- and remyelination in the CNS: lessons learned’, *Frontiers in cellular neuroscience*, 8, p. 73.

Hablitz, L.M. and Nedergaard, M. (2021) ‘The Glymphatic System: A Novel Component of Fundamental Neurobiology’, *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 41(37), p. 7698.

Hamby, M.E. and Sofroniew, M.V. (2010) ‘Reactive astrocytes as therapeutic targets for CNS disorders’, *Neurotherapeutics: the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 7(4), pp. 494–506.

Hibbits, N. *et al.* (2012) ‘Astroglisis during acute and chronic cuprizone demyelination and implications for remyelination’, *ASN neuro*, 4(6), pp. 393–408.

Hippius, H. (1999) ‘A historical perspective of clozapine’, *The Journal of clinical psychiatry*, 60 Suppl 12, pp. 22–23.

Hollenstein, D.M. and Kraft, C. (2020) ‘Autophagosomes are formed at a distinct cellular structure’, *Current opinion in cell biology*, 65, p. 50.

Hui, M. and Beier, K.T. (2022) ‘Defining the interconnectivity of the medial prefrontal cortex and ventral midbrain’, *Frontiers in molecular neuroscience*, 15, p. 971349.

Javed, K., Reddy, V. and Lui, F. (2019) ‘Neuroanatomy, Cerebral Cortex’. Available at: <https://europepmc.org/article/nbk/nbk537247?client=bot> (Accessed: 10 March 2024).

Jhelum, P. *et al.* (2020) ‘Ferroptosis Mediates Cuprizone-Induced Loss of Oligodendrocytes and Demyelination’, *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 40(48), pp. 9327–9341.

Jiang, L. *et al.* (2016) ‘Clozapine metabolites protect dopaminergic neurons through inhibition of microglial NADPH oxidase’, *Journal of neuroinflammation*, 13(1), p. 110.

Jiang, X., Stockwell, B.R. and Conrad, M. (2021) ‘Ferroptosis: mechanisms, biology and role in disease’, *Nature reviews. Molecular cell biology*, 22(4). Available at: <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00324-8>.

Ji, B. *et al.* (2009) ‘A comparative proteomics analysis of rat mitochondria from the cerebral cortex and hippocampus in response to antipsychotic medications’, *Journal of proteome research*, 8(7). Available at: <https://doi.org/10.1021/pr800876z>.

Kapur, S. and Seeman, P. (2001) ‘Does fast dissociation from the dopamine d(2) receptor explain the action of atypical antipsychotics?: A new hypothesis’, *The American journal of psychiatry*, 158(3), pp. 360–369.

Keller, D., Erö, C. and Markram, H. (2018) 'Cell Densities in the Mouse Brain: A Systematic Review', *Frontiers in neuroanatomy*, 12, p. 394837.

Kettenmann, H. and Verkhratsky, A. (2008) 'Neuroglia: the 150 years after', *Trends in neurosciences*, 31(12), pp. 653–659.

Khakipoor, S. *et al.* (2019) 'Functional expression of electrogenic sodium bicarbonate cotransporter 1 (NBCe1) in mouse cortical astrocytes is dependent on S255-257 and regulated by mTOR', *Glia*, 67(12), pp. 2264–2278.

Khokhar, J.Y. *et al.* (2018) 'Unique Effects of Clozapine: A Pharmacological Perspective', *Advances in pharmacology*, 82, pp. 137–162.

Kim, D.D. *et al.* (2020) 'Clozapine-Associated Obsessive-Compulsive Symptoms and Their Management: A Systematic Review and Analysis of 107 Reported Cases', *Psychotherapy and psychosomatics*, 89(3), pp. 151–160.

Kim, H.J. *et al.* (2017) 'Deficient autophagy in microglia impairs synaptic pruning and causes social behavioral defects', *Molecular psychiatry*, 22(11). Available at: <https://doi.org/10.1038/mp.2016.103>.

Kipp, M. (2023) 'Astrocytes: Lessons Learned from the Cuprizone Model', *International journal of molecular sciences*, 24(22). Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms242216420>.

Klauser, A.M. *et al.* (2018) 'Metabolites predict lesion formation and severity in relapsing-remitting multiple sclerosis', *Multiple sclerosis*, 24(4), pp. 491–500.

Koppula, P., Zhuang, L. and Gan, B. (2021) 'Cystine transporter SLC7A11/xCT in cancer: ferroptosis, nutrient dependency, and cancer therapy', *Protein & cell*, 12(8), pp. 599–620.

Koutsoudaki, P.N. *et al.* (2009) 'Demyelination of the hippocampus is prominent in the cuprizone model', *Neuroscience letters*, 451(1). Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2008.11.058>.

Kucerova, J. *et al.* (2014) 'Therapeutic potential of cannabinoids in schizophrenia', *Recent patents on CNS drug discovery*, 9(1). Available at: <https://doi.org/10.2174/1574889809666140307115532>.

Labib, D. *et al.* (2022) 'Proteomic Alterations and Novel Markers of Neurotoxic Reactive Astrocytes in Human Induced Pluripotent Stem Cell Models', *Frontiers in molecular neuroscience*, 15, p. 870085.

Le Cozannet, R., Fone, K.C. and Moran, P.M. (2010) 'Phencyclidine withdrawal disrupts episodic-like memory in rats: reversal by donepezil but not clozapine', *The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum*, 13(8). Available at: <https://doi.org/10.1017/S1461145710000234>.

Lee, F.H.F. *et al.* (2018) 'Specific Alterations in Astrocyte Properties via the GluA2-GAPDH Complex Associated with Multiple Sclerosis', *Scientific reports*, 8(1). Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31318-4>.

Leger, M. *et al.* (2013) 'Object recognition test in mice', *Nature protocols*, 8(12), pp. 2531–2537.

de Leon, J. *et al.* (2020) 'A Rational Use of Clozapine Based on Adverse Drug Reactions, Pharmacokinetics, and Clinical Pharmacopsychology', *Psychotherapy and psychosomatics*, 89(4), pp. 200–214.

Levin-Arama, M. *et al.* (2016) 'Subcutaneous Compared with Intraperitoneal Ketamine–Xylazine for Anesthesia of Mice', *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science: JAALAS*, 55(6), p. 794.

Liang, J. *et al.* (2018) 'Sulforaphane Inhibits Inflammatory Responses of Primary Human T-Cells by Increasing ROS and Depleting Glutathione', *Frontiers in immunology*, 9. Available at: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02584>.

Liao, C.Y., Lei, C.Q. and Shu, H.B. (2021) 'PCBP1 modulates the innate immune response by facilitating the binding of cGAS to DNA', *Cellular & molecular immunology*, 18(10). Available at: <https://doi.org/10.1038/s41423-020-0462-3>.

Licht-Mayer, S. *et al.* (2020) 'Enhanced axonal response of mitochondria to demyelination offers neuroprotection: implications for multiple sclerosis', *Acta neuropathologica*, 140(2), pp. 143–167.

Liddelow, S.A. *et al.* (2017) 'Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia', *Nature*, 541(7638), pp. 481–487.

Liddelow, S.A., Olsen, M.L. and Sofroniew, M.V. (2024) 'Reactive Astrocytes and Emerging Roles in Central Nervous System (CNS) Disorders', *Cold Spring Harbor perspectives in biology* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a041356>.

Li, J. *et al.* (2020) 'Ferroptosis: past, present and future', *Cell death & disease*, 11(2), pp. 1–13.

Lima, A. *et al.* (2014) 'Astrocyte pathology in the prefrontal cortex impairs the cognitive function of rats', *Molecular psychiatry*, 19(7), pp. 834–841.

Lindenmayer, J.P., Grochowski, S. and Mabus, L. (1994) 'Clozapine effects on positive and negative symptoms: a six-month trial in treatment-refractory schizophrenics', *Journal of clinical psychopharmacology*, 14(3), pp. 201–204.

Linnerbauer, M. and Rothhammer, V. (2020) 'Protective Functions of Reactive Astrocytes Following Central Nervous System Insult', *Frontiers in immunology*, 11, p. 573256.

Liu, R. *et al.* (2022) 'NOX activation in reactive astrocytes regulates astrocytic LCN2 expression and neurodegeneration', *Cell death & disease*, 13(4). Available at: <https://doi.org/10.1038/s41419-022-04831-8>.

Machado, J.P.D. *et al.* (2024) 'Cannabidiol modulates hippocampal genes involved in mitochondrial function, ribosome biogenesis, synapse organization, and chromatin modifications', *Acta neuropsychiatrica* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1017/neu.2024.13>.

- Mallya, A.P. and Deutch, A.Y. (2018) '(Micro)Glia as Effectors of Cortical Volume Loss in Schizophrenia', *Schizophrenia bulletin*, 44(5), pp. 948–957.
- Mangiatoridi, G.F. *et al.* (2023) 'Endocannabinoid Degradation Enzyme Inhibitors as Potential Antipsychotics: A Medicinal Chemistry Perspective', *Biomedicines*, 11(2). Available at: <https://doi.org/10.3390/biomedicines11020469>.
- Mao, J. *et al.* (2020) 'PCBP2 promotes the development of glioma by regulating FHL3/TGF- β /Smad signaling pathway', *Journal of cellular physiology*, 235(4). Available at: <https://doi.org/10.1002/jcp.29104>.
- Mao, X. *et al.* (2016) 'PCBP2 Modulates Neural Apoptosis and Astrocyte Proliferation After Spinal Cord Injury', *Neurochemical research*, 41(9). Available at: <https://doi.org/10.1007/s11064-016-1953-6>.
- Martins-de-Souza, D., Lebar, M. and Turck, C.W. (2011) 'Proteome analyses of cultured astrocytes treated with MK-801 and clozapine: similarities with schizophrenia', *European archives of psychiatry and clinical neuroscience*, 261(3), pp. 217–228.
- Matejuk, A. and Ransohoff, R.M. (2020) 'Crosstalk Between Astrocytes and Microglia: An Overview', *Frontiers in immunology*, 11. Available at: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01416>.
- Mederos, S. *et al.* (2020) 'GABAergic signaling to astrocytes in the prefrontal cortex sustains goal-directed behaviors', *Nature neuroscience*, 24(1), pp. 82–92.
- Meltzer, H.Y. *et al.* (2003) 'Serotonin receptors: their key role in drugs to treat schizophrenia', *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, 27(7), pp. 1159–1172.
- Molina-Gonzalez, I. *et al.* (2023) 'Astrocyte-oligodendrocyte interaction regulates central nervous system regeneration', *Nature communications*, 14(1), p. 3372.
- Moreno-Luna, R. *et al.* (2021) 'Heterogeneity of the Endocannabinoid System Between Cerebral Cortex and Spinal Cord Oligodendrocytes', *Molecular neurobiology*, 58(2). Available at: <https://doi.org/10.1007/s12035-020-02148-1>.
- Morgan, M.L. *et al.* (2022) 'Cuprizone-induced Demyelination in Mouse Brain is not due to Depletion of Copper', *ASN neuro*, 14, p. 17590914221126367.
- Nack, A. *et al.* (2019) 'Expression of Translocator Protein and [18F]-GE180 Ligand Uptake in Multiple Sclerosis Animal Models', *Cells*, 8(2). Available at: <https://doi.org/10.3390/cells8020094>.
- Nasrallah, H.A. (2008) 'Atypical antipsychotic-induced metabolic side effects: insights from receptor-binding profiles', *Molecular psychiatry*, 13(1), pp. 27–35.
- Novakovic, M.M. *et al.* (2023) 'Astrocyte reactivity and inflammation-induced depression-like behaviors are regulated by Orai1 calcium channels', *Nature communications*, 14(1), pp. 1–20.
- Nutma, E. *et al.* (2020) 'Astrocyte and Oligodendrocyte Cross-Talk in the Central Nervous

System', *Cells*, 9(3). Available at: <https://doi.org/10.3390/cells9030600>.

Ohgomori, T. and Jinno, S. (2021) 'Signal Transducer and Activator of Transcription 3 Activation in Hippocampal Neural Stem Cells and Cognitive Deficits in Mice Following Short-term Cuprizone Exposure', *Neuroscience*, 472. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2021.07.031>.

Oveland, E. *et al.* (2021) 'Cuprizone and EAE mouse frontal cortex proteomics revealed proteins altered in multiple sclerosis', *Scientific reports*, 11(1), pp. 1–16.

Panizzutti, B. *et al.* (2023) 'Effects of antipsychotic drugs on energy metabolism', *European archives of psychiatry and clinical neuroscience* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00406-023-01727-2>.

Pasquini, L.A. *et al.* (2007) 'The neurotoxic effect of cuprizone on oligodendrocytes depends on the presence of pro-inflammatory cytokines secreted by microglia', *Neurochemical research*, 32(2), pp. 279–292.

Patergnani, S. *et al.* (2021) 'Antipsychotic drugs counteract autophagy and mitophagy in multiple sclerosis', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(24). Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.2020078118>.

Pattingre, S. *et al.* (2005) 'Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy', *Cell*, 122(6), pp. 927–939.

Pekny, M., Wilhelmsson, U. and Pekna, M. (2014) 'The dual role of astrocyte activation and reactive gliosis', *Neuroscience letters*, 565, pp. 30–38.

Perea, G., Navarrete, M. and Araque, A. (2009) 'Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information', *Trends in neurosciences*, 32(8), pp. 421–431.

Peterson, A.R. and Binder, D.K. (2020) 'Astrocyte Glutamate Uptake and Signaling as Novel Targets for Antiepileptogenic Therapy', *Frontiers in neurology*, 11, p. 1006.

Pickar, D. *et al.* (1992) 'Clinical and biologic response to clozapine in patients with schizophrenia. Crossover comparison with fluphenazine', *Archives of general psychiatry*, 49(5), pp. 345–353.

Praet, J. *et al.* (2014) 'Cellular and molecular neuropathology of the cuprizone mouse model: clinical relevance for multiple sclerosis', *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 47, pp. 485–505.

Priego, N. *et al.* (2018) 'STAT3 labels a subpopulation of reactive astrocytes required for brain metastasis', *Nature medicine*, 24(7). Available at: <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0044-4>.

Richards, K. *et al.* (2011) 'Segmentation of the mouse hippocampal formation in magnetic resonance images', *Neuroimage*. 2011 Oct 1;58(3):732-40. Available at: doi: 10.1016/j.neuroimage.2011.06.025.

Rodrigues da Silva, N. *et al.* (2020) 'Cannabidiol attenuates behavioral changes in a rodent model of schizophrenia through 5-HT1A, but not CB1 and CB2 receptors', *Pharmacological*

research: the official journal of the Italian Pharmacological Society, 156, p. 104749.

Ryu, M.-S. *et al.* (2017) 'PCBP1 and NCOA4 regulate erythroid iron storage and heme biosynthesis', *The Journal of clinical investigation*, 127(5), pp. 1786–1797.

Schmittgen, T.D. and Livak, K.J. (2008) 'Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method', *Nature protocols*, 3(6), pp. 1101–1108.

Schröder, H., Moser, N. and Huguenberger, S. (2020) 'The Mouse Cerebral Cortex', *Neuroanatomy of the Mouse*, pp. 231–265.

Schröder, L.J. *et al.* (2023) 'Dynamics of reactive astrocytes fosters tissue regeneration after cuprizone-induced demyelination', *Glia*, 71(11). Available at: <https://doi.org/10.1002/glia.24440>.

Schultz, C. and Engelhardt, M. (2014) 'Anatomy of the hippocampal formation', *Frontiers of neurology and neuroscience*, 34, pp. 6–17.

Seabra, G. *et al.* (2018) 'Proteomics and Lipidomics in the Elucidation of Endocannabinoid Signaling in Healthy and Schizophrenia Brains', *Proteomics*, 18(18). Available at: <https://doi.org/10.1002/pmic.201700270>.

Seeman, P. (2002) 'Atypical antipsychotics: mechanism of action', *Canadian journal of psychiatry. Revue canadienne de psychiatrie*, 47(1). Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11873706/> (Accessed: 2 March 2024).

Seeman, P. (2014) 'Clozapine, a fast-off-D2 antipsychotic', *ACS chemical neuroscience*, 5(1), pp. 24–29.

'Segmentation of the mouse hippocampal formation in magnetic resonance images' (2011) *NeuroImage*, 58(3), pp. 732–740.

Semyanov, A. and Verkhratsky, A. (2021) 'Astrocytic processes: from tripartite synapses to the active milieu', *Trends in neurosciences*, 44(10). Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tins.2021.07.006>.

Sen, M.K. *et al.* (2022) 'The roles of microglia and astrocytes in phagocytosis and myelination: Insights from the cuprizone model of multiple sclerosis', *Glia*, 70(7), pp. 1215–1250.

Sielaff, M. *et al.* (2017) 'Evaluation of FASP, SP3, and iST Protocols for Proteomic Sample Preparation in the Low Microgram Range', *Journal of proteome research*, 16(11). Available at: <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.7b00433>.

Singh, R.K. *et al.* (2009) 'Activation of the JAK-STAT pathway is necessary for desensitization of 5-HT_{2A} receptor-stimulated phospholipase C signalling by olanzapine, clozapine and MDL 100907', *The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum*, 12(5). Available at: <https://doi.org/10.1017/S1461145708009590>.

Sirbu, C.A. *et al.* (2023) 'Cannabis and Cannabinoids in Multiple Sclerosis: From Experimental Models to Clinical Practice-A Review', *American journal of therapeutics*,

30(3). Available at: <https://doi.org/10.1097/MJT.0000000000001568>.

Skipuletz, T. *et al.* (2013) 'Astrocytes regulate myelin clearance through recruitment of microglia during cuprizone-induced demyelination', *Brain: a journal of neurology*, 136(Pt 1), pp. 147–167.

Stamoula, E. *et al.* (2022) 'Atypical antipsychotics in multiple sclerosis: A review of their in vivo immunomodulatory effects', *Multiple sclerosis and related disorders*, 58. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.msard.2022.103522>.

Steiner, J. *et al.* (2014) 'Clozapine promotes glycolysis and myelin lipid synthesis in cultured oligodendrocytes', *Frontiers in cellular neuroscience*, 8. Available at: <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00384>.

Stepnicki, P., Kondej, M. and Kaczor, A.A. (2018) 'Current Concepts and Treatments of Schizophrenia', *Molecules : A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry*, 23(8). Available at: <https://doi.org/10.3390/molecules23082087>.

Strange, B.A. *et al.* (2014) 'Functional organization of the hippocampal longitudinal axis', *Nature reviews. Neuroscience*, 15(10), pp. 655–669.

Su, L.-J. *et al.* (2019) 'Reactive Oxygen Species-Induced Lipid Peroxidation in Apoptosis, Autophagy, and Ferroptosis', *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1155/2019/5080843>.

Sun, Q. *et al.* (2024) 'Clozapine-N-oxide protects dopaminergic neurons against rotenone-induced neurotoxicity by preventing ferritinophagy-mediated ferroptosis', *Free radical biology & medicine*, 212. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2023.12.045>.

Tanahashi, S. *et al.* (2012) 'Clozapine, but not haloperidol, enhances glial D-serine and L-glutamate release in rat frontal cortex and primary cultured astrocytes', *British journal of pharmacology*, 165(5), pp. 1543–1555.

Taraboletti, A. *et al.* (2017) 'Cuprizone Intoxication Induces Cell Intrinsic Alterations in Oligodendrocyte Metabolism Independent of Copper Chelation', *Biochemistry*, 56(10), pp. 1518–1528.

Templeton, N. *et al.* (2019) 'Clozapine administration enhanced functional recovery after cuprizone demyelination', *PloS one*, 14(5). Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216113>.

'The antibody rHIgM22 facilitates hippocampal remyelination and ameliorates memory deficits in the cuprizone mouse model of demyelination' (2018) *Brain research*, 1694, pp. 73–86.

Tiihonen, J. *et al.* (2017) 'Pharmacological treatments and risk of readmission to hospital for unipolar depression in Finland: a nationwide cohort study', *The lancet. Psychiatry*, 4(7), pp. 547–553.

Torkildsen, O. *et al.* (2008) 'The cuprizone model for demyelination', *Acta neurologica Scandinavica. Supplementum*, 188, pp. 72–76.

- Toutouna, L. *et al.* (2016) 'Hes3 expression in the adult mouse brain is regulated during demyelination and remyelination', *Brain research*, 1642. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.03.014>.
- Tran, H.Q. *et al.* (2018) 'Clozapine attenuates mitochondrial burdens and abnormal behaviors elicited by phencyclidine in mice via inhibition of p47 phox; Possible involvements of phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling', *Journal of psychopharmacology*, 32(11). Available at: <https://doi.org/10.1177/0269881118795244>.
- Vandesompele, J. *et al.* (2002) 'Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes', *Genome biology*, 3(7), pp. 1–12.
- Varhaug, K.N. *et al.* (2020) 'Mitochondrial complex IV is lost in neurons in the cuprizone mouse model', *Mitochondrion*, 50. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.mito.2019.09.003>.
- Vection, S., O'Callaghan, D. and Keriel, A. (2022) 'CD98hc in host-pathogen interactions: roles of the multifunctional host protein during infections', *FEMS microbiology reviews*, 46(5). Available at: <https://doi.org/10.1093/femsre/fuac023>.
- Vega-Riquer, J.M. *et al.* (2019) 'Five Decades of Cuprizone, an Updated Model to Replicate Demyelinating Diseases', *Current neuropharmacology*, 17(2), pp. 129–141.
- Verkhatsky, A. *et al.* (2021) 'Astrocytes: The Housekeepers and Guardians of the CNS', *Advances in neurobiology*, 26, p. 21.
- Verkhatsky, A. and Nedergaard, M. (2016) 'The homeostatic astroglia emerges from evolutionary specialization of neural cells', *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 371(1700). Available at: <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0428>.
- Verkhatsky, A. and Nedergaard, M. (2018) 'Physiology of Astroglia', *Physiological reviews*, 98(1), pp. 239–389.
- Verkhatsky, A., Nedergaard, M. and Hertz, L. (2015) 'Why are astrocytes important?', *Neurochemical research*, 40(2). Available at: <https://doi.org/10.1007/s11064-014-1403-2>.
- Voss, E.V. *et al.* (2012) 'Characterisation of microglia during de- and remyelination: can they create a repair promoting environment?', *Neurobiology of disease*, 45(1), pp. 519–528.
- Wang, Y., Fu, A.K.Y. and Ip, N.Y. (2022) 'Instructive roles of astrocytes in hippocampal synaptic plasticity: neuronal activity-dependent regulatory mechanisms', *The FEBS journal*, 289(8), pp. 2202–2218.
- Wenthur, C.J. and Lindsley, C.W. (2013) 'Classics in chemical neuroscience: clozapine', *ACS chemical neuroscience*, 4(7), pp. 1018–1025.
- Wiley, J.L. *et al.* (2008) 'Antipsychotic-Induced Alterations in CB1 Receptor-Mediated G-Protein Signaling and In Vivo Pharmacology in Rats', *Neuropharmacology*, 55(7), p. 1183.
- Willcocks, I.R. *et al.* (2021) 'Clozapine Metabolism is Associated With Absolute Neutrophil Count in Individuals With Treatment-Resistant Schizophrenia', *Frontiers in pharmacology*, 12, p. 658734.

- Wu, H. *et al.* (2014) 'The BCL2L1 and PGAM5 axis defines hypoxia-induced receptor-mediated mitophagy', *Autophagy*, 10(10). Available at: <https://doi.org/10.4161/auto.29568>.
- Xie, Y. *et al.* (2016) 'Ferroptosis: process and function', *Cell death and differentiation*, 23(3). Available at: <https://doi.org/10.1038/cdd.2015.158>.
- Xuan, Y. *et al.* (2015) 'The cuprizone-induced changes in (1)H-MRS metabolites and oxidative parameters in C57BL/6 mouse brain: Effects of quetiapine', *Neurochemistry international*, 90. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2015.08.015>.
- Xu, H. *et al.* (2010) 'Behavioral and Neurobiological Changes in C57BL/6 Mouse Exposed to Cuprizone: Effects of Antipsychotics', *Frontiers in behavioral neuroscience*, 4. Available at: <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2010.00008>.
- Yang, W.S. and Stockwell, B.R. (2008) 'Synthetic lethal screening identifies compounds activating iron-dependent, nonapoptotic cell death in oncogenic-RAS-harboring cancer cells', *Chemistry & biology*, 15(3), pp. 234–245.
- Yang, Y. and Xu, L. (2020) 'Autophagy and Schizophrenia', *Advances in experimental medicine and biology*, 1207. Available at: https://doi.org/10.1007/978-981-15-4272-5_13.
- Yan, H.-F. *et al.* (2021) 'Ferroptosis: mechanisms and links with diseases', *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1), pp. 1–16.
- Young, C.R. *et al.* (1997) 'The expanding indications for clozapine', *Experimental and clinical psychopharmacology*, 5(3), pp. 216–234.
- Yue, L. *et al.* (2022) 'PCBP2 knockdown promotes ferroptosis in malignant mesothelioma', *Pathology international*, 72(4). Available at: <https://doi.org/10.1111/pin.13209>.
- Yuen, J.W.Y. *et al.* (2021) 'A Focused Review of the Metabolic Side-Effects of Clozapine', *Frontiers in endocrinology*, 12. Available at: <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.609240>.
- Zajicek, J.P. (2011) 'Role of cannabinoids in multiple sclerosis', *CNS drugs*, 25(3). Available at: <https://doi.org/10.2165/11539000-000000000-00000>.
- Zhang, D. *et al.* (2024) 'Ancient dormant virus remnant ERVW-1 drives ferroptosis via degradation of GPX4 and SLC3A2 in schizophrenia', *Virologica Sinica*, 39(1), p. 31.
- Zhang, H.-Y. *et al.* (2020) 'A1 astrocytes contribute to murine depression-like behavior and cognitive dysfunction, which can be alleviated by IL-10 or fluorocitrate treatment', *Journal of neuroinflammation*, 17(1), pp. 1–13.
- Zhang, W. *et al.* (2022) 'Thiostrepton induces ferroptosis in pancreatic cancer cells through STAT3/GPX4 signalling', *Cell death & disease*, 13(7). Available at: <https://doi.org/10.1038/s41419-022-05082-3>.
- Zhan, J. *et al.* (2020) 'The Cuprizone Model: Dos and Do Nots', *Cells*, 9(4). Available at: <https://doi.org/10.3390/cells9040843>.
- Zirngibl, M. *et al.* (2022) 'Oligodendrocyte death and myelin loss in the cuprizone model: an

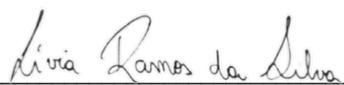
updated overview of the intrinsic and extrinsic causes of cuprizone demyelination', *Molecular neurodegeneration*, 17(1), pp. 1–28.

10 | ANEXOS

Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **ANÁLISE DA REATIVIDADE DE ASTRÓCITOS E PERFIL PROTEÔMICO DE CAMUNDONGOS EXPOSTOS À CUPRIZONA E TRATADOS COM O ANTIPSICÓTICO CLOZAPINA**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 22 de agosto de 2024

Assinatura : 
Nome do(a) autor(a): **Livia Ramos da Silva**
RG n.º 42.263.437-2

Assinatura : 
Nome do(a) orientador(a): **Daniel Martins de Souza**
RG n.º 32.431.379-2



Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp



CEUA/Unicamp

INFORMAÇÃO

A Comissão de Ética no Uso de Animais da UNICAMP – CEUA/UNICAMP – esclarece que não há necessidade de submeter o projeto de pesquisa **“Análise proteômica e o perfil de ativação de astrócitos em camundongos tratados com cuprizona e clozapina”**, de responsabilidade do Prof. Dr. Daniel Martins de Souza e da executora Livia Ramos da Silva, para análise desta comissão.

Trata-se de projeto que irá apenas realizar a análise dos dados advindos a partir de experimentações do protocolo 5448-1/2019, cuja autorização para uso também resta aprovada com a anuência do Prof. Daniel (Responsável), para compor a dissertação de mestrado da aluna. Para este projeto, não haverá manipulação in vivo na Unicamp.

Campinas, 03 de fevereiro de 2023.

Prof. Dr. Wagner José Fávaro
Presidente
CEUA/UNICAMP

Eduardo Villaverde Haszler
Secretário Executivo
CEUA/UNICAMP

CEUA/UNICAMP
Rua Monteiro Lobato, 255
13083-862 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
http://www.ib.unicamp.br/comissoes/ceua_principal

Documento assinado eletronicamente por **WAGNER JOSE FAVARO, PRESIDENTE DA CEUA/UNICAMP**, em 10/02/2023, às 11:58 horas, conforme Art. 10 § 2º da MP 2.200/2001 e Art. 1º da Resolução GR 54/2017.

Documento assinado eletronicamente por **EDUARDO VILLAVERDE HASZLER, SECRETÁRIO EXECUTIVO DA CEUA/UNICAMP**, em 03/02/2023, às 11:46 horas, conforme Art. 10 § 2º da MP 2.200/2001 e Art. 1º da Resolução GR 54/2017.



A autenticidade do documento pode ser conferida no site:
sigad.unicamp.br/verifica, informando o código verificador:
A1DC21E1 21284E91 A07B2AD5 B9359E5A





CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **O papel da síntese de colesterol no mecanismo de ação da Clozapina em modelos experimentais para Esquizofrenia**, registrada com o nº **5448-1(A)/2021**, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Daniel Martins de Souza e Fernanda Crunfli**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA)**, tendo sido aprovada pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em reunião de **19/08/2021**.

| Finalidade: | () Ensino (X) Pesquisa Científica |
|--|--------------------------------------|
| Vigência do projeto: | 01/09/2021 a 06/01/2023 |
| Vigência da autorização para manipulação animal: | 19/08/2021 a 06/01/2023 |
| Espécie / linhagem/ raça: | Camundongo isogênico / C57BL/6JUnib |
| No. de animais: | 8 |
| Idade/Peso: | 8.00 Semanas / 25.00 Gramas |
| Sexo: | 8 Machos |
| Espécie / linhagem/ raça: | Camundongo isogênico / C57BL/6JUnib |
| No. de animais: | 8 |
| Idade/Peso: | 8.00 Semanas / 25.00 Gramas |
| Sexo: | 8 Machos |
| Espécie / linhagem/ raça: | Camundongo isogênico / C57BL/6JUnib |
| No. de animais: | 8 |
| Idade/Peso: | 8.00 Semanas / 25.00 Gramas |
| Sexo: | 8 Machos |
| Espécie / linhagem/ raça: | Camundongo isogênico / C57BL/6JUnib |
| No. de animais: | 8 |
| Idade/Peso: | 8.00 Semanas / 25.00 Gramas |
| Sexo: | 8 Machos |
| Espécie / linhagem/ raça: | Camundongo isogênico / C57BL/6JUnib |
| No. de animais: | 8 |
| Idade/Peso: | 8.00 Semanas / 25.00 Gramas |

CERTIFICADO CEUA nº 184/2021

| | |
|---|--|
| Sexo: | 8 Machos |
| Espécie / linhagem/ raça: | Camundongo isogênico / C57BL/6JUnib |
| No. de animais: | 8 |
| Idade/Peso: | 8.00 Semanas / 25.00 Gramas |
| Sexo: | 8 Machos |
| Espécie / linhagem/ raça: | Camundongo isogênico / C57BL/6JUnib |
| No. de animais: | 8 |
| Idade/Peso: | 8.00 Semanas / 25.00 Gramas |
| Sexo: | 8 Machos |
| Origem: | CEMIB |
| Biotério onde serão mantidos os animais: | Biotério 1 - Área de Fisiologia e Biofísica, DBEF/IB/UNICAMP |

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização a junto ao **IBAMA, SISBIO** ou **CIBio** e é **restrita** a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, **26 de agosto de 2021.**

 Prof. Dr. Wagner José Fávaro
 Presidente

 Rosângela dos Santos
 Secretária Executiva

IMPORTANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.

Documento assinado eletronicamente por **WAGNER JOSE FAVARO, COORDENADOR CEUA/UNICAMP**, em 26/08/2021, às 17:16 horas, conforme Art. 10 § 2º da MP 2.200/2001 e Art. 1º da Resolução GR 54/2017.

Documento assinado eletronicamente por **ROSANGELA DOS SANTOS, SECRETÁRIA EXECUTIVA CEUA/UNICAMP**, em 27/08/2021, às 09:21 horas, conforme Art. 10 § 2º da MP 2.200/2001 e Art. 1º da Resolução GR 54/2017.



A autenticidade do documento pode ser conferida no site:
sigad.unicamp.br/verifica, informando o código verificador:
985D2A0D 1239400E BCF3C991 7625D01C





CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada O papel da síntese de colesterol no mecanismo de ação da Clozapina em modelos experimentais para Esquizofrenia, registrada com o nº 5448-1/2019, sob a responsabilidade de Prof. Dr. Daniel Martins de Souza e Fernanda Crunfji, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP, em reunião de 14/11/2019.

| | |
|--|---|
| Finalidade: | <input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica |
| Vigência do projeto: | 06/01/2020 a 06/01/2023 |
| Vigência da autorização para manipulação animal: | 14/11/2019 a 06/01/2023 |
| Espécie / linhagem/ raça: | Camundongo isogênico / C57BL/6JUnib |
| No. de animais: | 9 |
| Idade/Peso: | 8.00 Semanas / 25.00 Gramas |
| Sexo: | 9 Machos |
| Espécie / linhagem/ raça: | Camundongo isogênico / C57BL/6JUnib |
| No. de animais: | 9 |
| Idade/Peso: | 8.00 Semanas / 25.00 Gramas |
| Sexo: | 9 Machos |
| Espécie / linhagem/ raça: | Camundongo isogênico / C57BL/6JUnib |
| No. de animais: | 9 |
| Idade/Peso: | 8.00 Semanas / 25.00 Gramas |
| Sexo: | 9 Machos |
| Espécie / linhagem/ raça: | Camundongo isogênico / C57BL/6JUnib |
| No. de animais: | 9 |
| Idade/Peso: | 8.00 Semanas / 25.00 Gramas |
| Sexo: | 9 Machos |
| Espécie / linhagem/ raça: | Camundongo isogênico / C57BL/6JUnib |
| No. de animais: | 9 |
| Idade/Peso: | 8.00 Semanas / 25.00 Gramas |
| Sexo: | 9 Machos |
| Espécie / linhagem/ raça: | Camundongo isogênico / C57BL/6JUnib |
| No. de animais: | 9 |
| Idade/Peso: | 8.00 Semanas / 25.00 Gramas |
| Sexo: | 9 Machos |
| Espécie / linhagem/ raça: | Camundongo isogênico / C57BL/6JUnib |
| No. de animais: | 9 |
| Idade/Peso: | 6.00 Semanas / 20.00 Gramas |
| Sexo: | 9 Machos |
| Espécie / linhagem/ raça: | Camundongo isogênico / C57BL/6JUnib |
| No. de animais: | 9 |
| Idade/Peso: | 6.00 Semanas / 20.00 Gramas |
| Sexo: | 9 Machos |
| Espécie / linhagem/ raça: | Camundongo isogênico / C57BL/6JUnib |
| No. de animais: | 9 |
| Idade/Peso: | 6.00 Semanas / 20.00 Gramas |

OK

