

Título: Inibição da atividade colinesterase (ChE) pelo haloperidol em diferentes estruturas encefálicas de camundongos e correlação com seu efeito adverso motor

Projeto apresentado à Pró-reitora de Pesquisa da Universidade Federal do ABC - Programa de Iniciação Científica da UFABC, Edital no. **04/2022.**

**São Bernardo do Campo
2022**

RESUMO

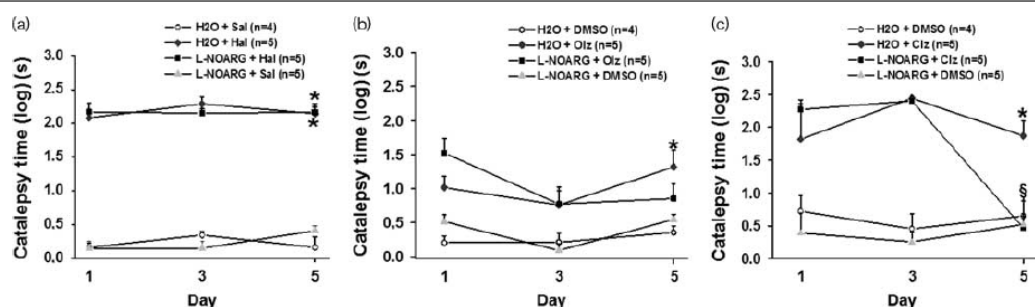
Drogas antipsicóticas (APDs) são frequentemente usadas para o tratamento de sintomas comportamentais e psicológicos de algumas demências (*behavioral and psychological symptoms of dementia*, BPSD), especialmente a psicose e distúrbios comportamentais (por exemplo, agressão e agitação). Entre as drogas para o tratamento da doença de Alzheimer (DA), os inibidores da colinesterase (ChEIs, por exemplo, donepezil e galantamina) têm uma propensão a potencializar os efeitos colaterais extrapiramidais (EPS) induzidos pelas APDs, incluindo sintomas parkinsonianos (bradicinesia, acinesia, tremor e rigidez muscular), os quais são estudados em modelos animais por meio do teste da catalepsia, e do desempenho motor no teste do *rotarod*. Portanto, a escolha adequada do antipsicótico, determinar o intervalo das doses consideradas sem EPS, assim como a estratégia de combinação com os medicamentos utilizados na DA, termina sendo crucial na medicina para o tratamento dos BPSD. Também é possível identificar, que aqueles antipsicóticos com efeito ChEIs podem ajudar a estabilizar a função cognitiva nos pacientes com DA, além do seu efeito sobre os BPSD. Esse resultado sinérgico pode ser também explicado pelo efeito antimuscarínico das APDs, possivelmente bloqueando o receptor M2 (acoplados a uma proteína Gi/O, inibitória, que atua inibindo a adenilciclase), ou promovendo os efeitos terapêuticos da inibição da colinesterase (ChE) na DA. Assim, no presente estudo, pretende-se avaliar: (I) o efeito do antipsicótico típico haloperidol (Hal) sobre a atividade enzimática da colinesterase (ChE) no homogeneizado de proteínas de diferentes regiões do encéfalo de camundongos, com o interesse farmacológico na identificação deste antipsicótico com efeito ChEIs; (II) a atividade da ChE nas regiões do encéfalo de camundongos previamente tratados com o Hal, em diferentes doses consideradas terapêuticas, como estratégia para correlacionar se o efeito adverso da catalepsia estaria associada à inibição da ChE. Serão utilizados camundongos adultos (3 a 4 meses de idade) machos ou fêmeas de linhagem *Swiss* com maturidade sexual, provenientes do Biotério da UFABC. Inicialmente, os tecidos encefálicos (córtex pré-frontal, corpo estriado, septum, hipocampo, tronco encefálico, cerebelo e hipotálamo) de animais saudáveis serão coletados para obtenção do homogeneizado de proteínas solúveis. O efeito do Hal sobre a atividade da ChE será avaliado por reação colorimétrica, utilizando o método de Ellman. Em outro protocolo experimental, animais tratados com o Hal, dose cataléptica ou não, assim como o seu grupo controle serão utilizados para coletar os mesmos tecidos citados acima para avaliar a atividade da ChE. Os dados obtidos serão expressos por concentração do substrato hidrolisado por tempo de hidrólise em 1 min por peso do de cada região encefálica ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$). As análises estatísticas serão realizadas com o auxílio do software Graph Prisma 5.0, utilizando o teste ANOVA de uma via com o pós-teste de Tukey.

Palavras-chave do projeto: neurolépticos, Alzheimer, método de Ellman, ChEIs, estriado, hipocampo, córtex pré-frontal, catalepsia.

1. INTRODUÇÃO

Previamente o nosso grupo investigou se doses consideradas catalépticas do antipsicótico típico Haloperidol (Hal, 1mg/kg/ip), ou dos atípicos Olanzapina (Olz, 15 mg/kg/ip) ou Clozapina (Clz, 20mg/kg/ip) poderiam sofrer *cross-tolerance* após inibição da formação do óxido nítrico (NO, inibidor L-NOARG 15mg/kg/ip), como se ilustra na seguinte figura (Fig. 1, Prieto *et al.*, 2018).

Fig. 1



Catalepsy time at 120 min after final injection on days 1, 3, and 5 of antipsychotic treatment. Statistical analysis was carried out with three-way repeated-measures analysis of variance (ANOVA) and by two-way ANOVA on day 5 and the Bonferroni post-hoc test. (a) L-NOARG 15 mg/kg and Hal (haloperidol) 1 mg/kg; (b) L-NOARG 15 mg/kg and Olz (olanzapine) 15 mg/kg; (c) L-NOARG 15 mg/kg and Clz (clozapine) 20 mg/kg. Treatments were carried out by continuous daily injections of antipsychotic drugs for a period of 5 days. L-NOARG was administered 30 min before injection of antipsychotics on days 1, 3, and 5. *Mean difference compared with the control group and L-NOARG + saline (Sal) ($P < 0.05$) (a), and between distilled water + Olz with the control group and L-NOARG + DMSO ($P < 0.05$) (b). *Mean difference compared with the other groups; [§]mean difference between distilled water + Clz compared with L-NOARG + Clz ($P < 0.05$) (c) showing a tolerance effect. Points represent the mean \pm SEM. L-NOARG, NG-nitro-L-arginine.

Figura 1: Tomado da publicação Prieto *et al.*, 2018, para ilustrar o efeito cataléptico induzido pelo antipsicótico típico Hal, e pelos atípicos Olz e Clz. Existe um interesse na neurofarmacologia por encontrar moléculas que possam induzir uma *cross-tolerance* e evitar o aparecimento dos EPS, como a catalepsia em animais ou catatonia em humanos.

Com tudo, este trabalho mostrou que só a dose cataléptica da Clz poderia sofrer *cross-tolerance* com o inibidor da formação do NO (L-NOARG). Mesmo que o principal objetivo desse estudo foi investigar o NO, uma vez que no estriado, as vias dopaminérgicas são moduladas pelos interneurônios nitrérgicos, existem também os interneurônios GABAérgicos e colinérgicos exercendo um efeito modulador sobre essas vias (Fig. 2, Prieto *et al.*, 2018). Os antipsicóticos são em alguma medida antagonistas dos receptores dopaminérgicos D2 (D2R) estriatais, e o seu uso por longo prazo pode modular a presença da acetilcolina (ACh) nessa microcircuiteria, provavelmente ocasionando aumento da atividade da ACh sobre os receptores muscarínicos M1 ou sobre os muscarínicos M2/4R, ou sobre os receptores tipo nicotínicos (nAChR),

explicando em alguma medida a aparição dos efeitos colaterais extrapiramidais (EPS) induzidos pelos antipsicóticos (Benarroch, 2012; Kaneko *et al.*, 2000).

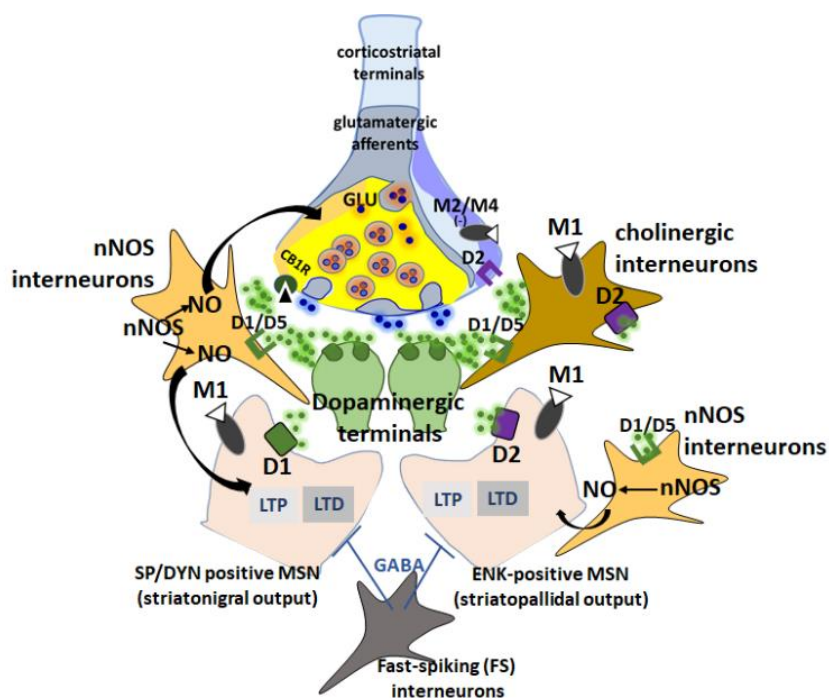


Figura 2: Microcircuitria estriatal. Os neurônios de projeção estriatal, também chamados espinhosos de tamanho médio (MSN, striatal medium-spiny neurons) são modulados por interneurônios nitrérgicos (NOS, Nítrico Oxide Synthase), e por interneurônios colinérgicos, e outros do tipo GABAérgicos. Os antipsicóticos na sua maioria têm um efeito antagonista sobre os receptores dopaminérgicos D2 (D2R) que são inibitórios (estimulam uma proteína Gi). Esse bloqueio deixa livre os interneurônios colinérgicos para liberar ACh, que agiria nos receptores muscarínicos M1 ou M2/M4, assim como também levaria a uma maior atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE). Existe a hipótese que os EPS possam ser precipitados pela presença da ACh de uma maneira aumentada e por maior tempo na fenda sináptica, e que os mesmos antipsicóticos possam inibir também a AChE, aumentando exageradamente a presença da ACh nessa microcircuitria, levando ao aparecimento dos EPS. Fonte: Modificado de Calabresi, P., Picconi, B., Tozzi, A., Ghiglieri, V. and Di Filippo, M. 2014.

Com tudo, mesmo com a existência de mais de 60 anos do seu uso como terapia na esquizofrenia, uma doença que compromete estruturas encefálicas como o córtex pré-frontal e o estriado (dorsal e ventral- N. Accumbens), pouco se sabe sobre o efeito destes antipsicóticos na inibição da enzima colinesterase (ChE), se eles são ou não em alguma medida inibidores da colinesterase (ChEIs) (Figura 3).

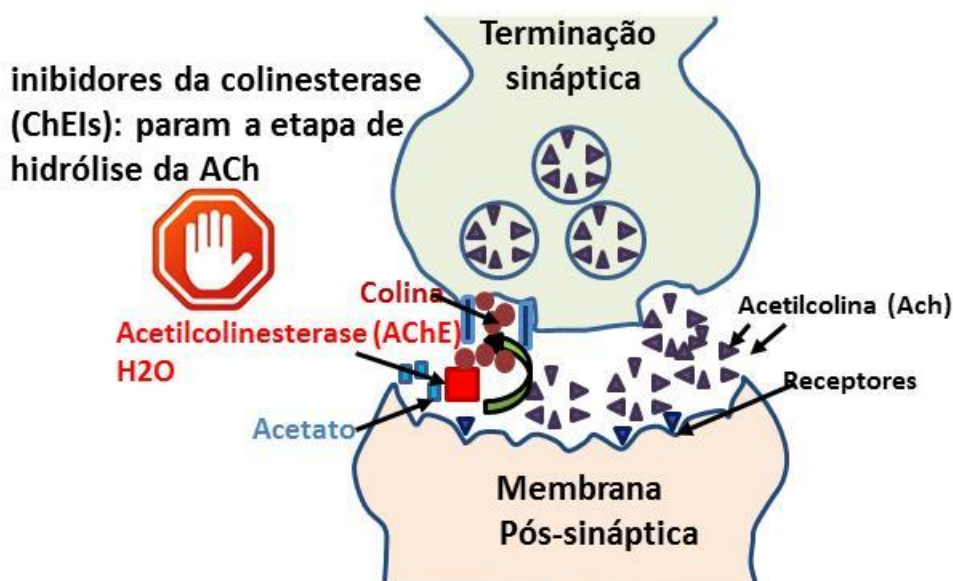


Figura 3: Sinapse colinérgica mostrando a liberação de Acetilcolina (ACh), a presença da Acetilcolinesterase (AChE) na fenda sináptica que metaboliza a ACh por meio de uma hidrólise, e libera acetato, e colina que é capturada pela terminação pré-sináptica, para formar mais ACh. Os ChEIs não permitem a hidrólise e a atividade da AChE é diminuída.

De fato, outro efeito secundário ocasionado pelo uso dos antipsicóticos, conhecido como discinesia tardia, tem sido explicada pelas alterações colinérgicas induzidas pelo Hal, por causa da sua atividade sobre a AChE, no corpo estriado, córtex pré-frontal e hipocampo, provavelmente diminuindo a atividade dessa enzima e aumentando a ACh na fenda sináptica (Valente de Oliveira *et al.*, 2013).

Por outro lado, tanto a esquizofrenia, assim como algumas demências cursam com alucinações visuais que podem surgir de uma desregulação dos sistemas colinérgicos cerebrais (nicotínico e muscarínico), sendo tratadas com os ChEIs, com efeito sobre a mesma psicose (Smart *et al.*, 2018). Um único relato mostra que APDs atípicos como a Clz (2,5-20 mg / kg), e Olz (10 mg / kg) aumentaram significativamente a liberação de ACh no córtex pré-frontal medial de ratos (mPFC) enquanto os APDs típicos, como o Hal (0,1-1 mg / kg) não mostrou efeito (Ichikawa *et al.*, 2002). Nenhuma das APDs aumentou a liberação de ACh no núcleo accumbens ou estriado nas doses efetivas no mPFC. Assim, APDs atípicos e típicos podem diferir na sua capacidade de aumentar a liberação de ACh cortical, um possível fator que contribui para a melhora cognitiva na esquizofrenia (Ichikawa *et al.*, 2002). Adicionalmente, pacientes com DA podem ser tratados com Clz para evitar os problemas de agressividade e motores (Lee *et al.*, 2007), assim como algumas alucinações, além de

uma possível melhora a nível cognitivo (Choi *et al.*, 2016) (site para ver os tratamentos permitidos na DA: <https://www.alz.org/alzheimers-dementia/treatments/treatments-for-behavior>). Um estudo prévio em humanos mostrou que os níveis séricos de oxidação lipídica induzida por NOx foram encontrados aumentados nos pacientes com DA, e o uso de APDs pode causar níveis mais baixos dessa oxidação lipídica em pacientes em terapia combinada com ChEIs permitidos na DA. Esses mesmos marcadores poderiam ser estudados numa seguinte fase no nosso trabalho.

O tratamento primário da DA é a farmacoterapia com ChEIs, como a Tacrina, Galantamina, Rivastigmina e Donepazil, que suprimem a progressão da doença e apenas suaviza levemente os sintomas da DA, aumentando a quantidade de ACh no encéfalo (Schott *et al.*, 2018). Embora o principal sintoma da DA seja a demência, vários sintomas comportamentais e psicológicos (*behavioral and psychological symptoms of dementia*, BPSD), como, agitação, delírios e alucinações, também são proeminentes – inclusive, as APDs são frequentemente usadas como tratamento destes sintomas. No entanto, algumas APDs são reportadas como antimuscarínicas e, conseqüentemente, como anticolinérgicas (Richelson and Souder *et al.*, 2000; Dahl *et al.*, 1988). Porém, poderiam também atuar como ChEIs na DA, uma estratégia terapêutica desejada.

Na figura 4 se ilustra no painel A as vias colinérgicas encefálicas, e no painel B a presença dos receptores do tipo muscarínicos no córtex pré-frontal, onde possivelmente poderiam agir os ChEIs na DA, e onde também tem efeito os antipsicóticos tanto no sistema dopaminérgico, assim como serotoninérgico neste

córtex.

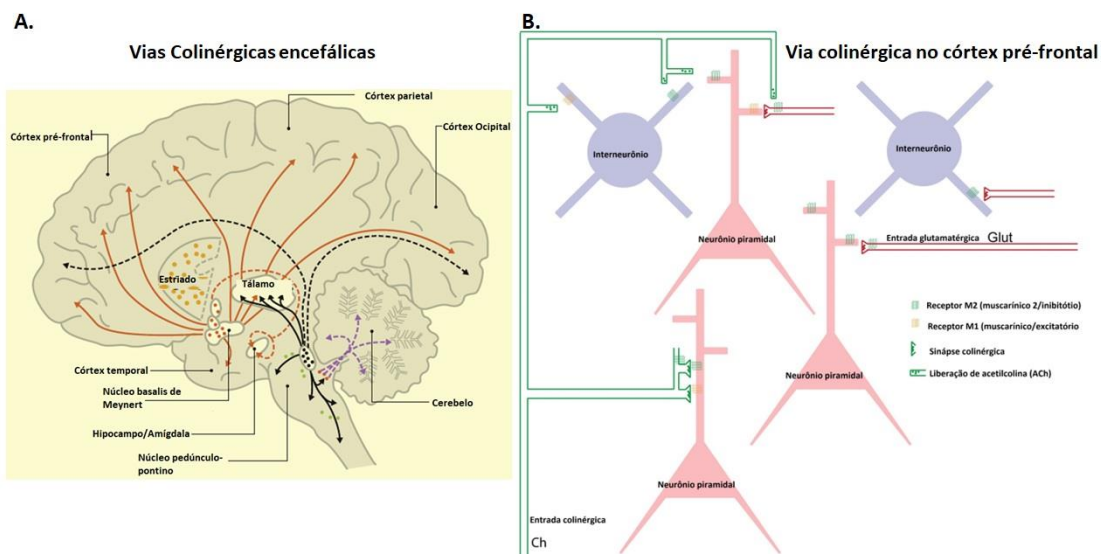


Figura 4: **Painel A** ilustra as vias colinérgicas encefálicas. Uma via anterior se origina no núcleo basalis de Meynert, que se encontra deteriorado na DA. Uma via posterior se origina no núcleo pedúnculo-pontino no tronco encefálico e que também parece estar deteriorado na DA e na doença de Parkinson. **Painel B** ilustra a entrada colinérgica no córtex pré-frontal, onde se integra a ‘*working memory*’ que está comprometida na DA. Podem ser observados os dois tipos de receptores muscarínicos (M1 e M2) que se encontram distribuídos tanto nos neurônios piramidais, assim como nos interneurônios, e na entrada glutamatergica. Desta forma, se mostra a presença desses receptores no córtex e perto deles deve estar a enzima ChE. Fontes: Keverne J & Ray, 2008; Vijayraghavan & Everling, 2021.

Com isso, pretende-se neste estudo, avaliar o efeito do antipsicótico Hal, na atividade enzimática da ChE obtida a partir do homogeneizado de proteínas de diferentes regiões do encéfalo de camundongos para investigar a possibilidade deste fármaco potencializar o tratamento de pacientes com DA, que utilizam ChEIs para tratamento. Após da avaliação *in vitro*, pretendemos testar três doses de Hal em camundongos, uma delas como dose cataléptica, para confirmar se o efeito cataléptico poderia estar associado ao efeito sobre essa atividade enzimática.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral:

Avaliar se o antipsicótico Hal é modulador da atividade da ChE em diferentes regiões encefálicas de camundongos (pré-frontal, corpo estriado, septum, hipocampo, tronco encefálico, cerebelo e hipotálamo).

2.2. Específicos:

1. Padronizar os ensaios de atividade da ChE no homogeneizado de proteínas de diferentes regiões do encéfalo de camundongos (pré-frontal, corpo estriado, septum, hipocampo, tronco encefálico, cerebelo e hipotálamo);
2. Avaliar o efeito do Hal sobre a atividade enzimática da colinesterase (ChE) no homogeneizado obtido;
3. Caracterizar a atividade da ChE nas regiões do encéfalo de camundongos *Swiss* previamente tratados com Hal nas doses: Hal 0,001 mg/kg/ip; Hal 0,1 mg/kg/ip; Hal 1 mg/kg/ip. Tratamento será com administração aguda, intraperitoneal, do Hal, com uma dose cataléptica já identificada previamente num estudo nosso (1 mg/kg/ip) e outras sem aparente efeito cataléptico (Hal 0,001 ou 0,1 mg/kg/ip), porém com conhecido efeito antipsicótico, além do grupo controle.

3. MATERIAIS E METODOLOGIA

Tipo de estudo: Estudo original, nas áreas de neuropsicofarmacologia, bioensaio, toxicocinética e neurodegenerativas.

3.1. Animais e reagentes

Camundongos adultos (6 a 8 semanas de idade) machos ou fêmeas da linhagem *C57Bl* com maturidade sexual, provenientes do Biotério da UFABC (Santo André – Brasil), com peso de 25 a 30g, serão utilizados no presente estudo. Os animais receberão alimentação padronizada para camundongos (Nuvilob CR – 1, NUVITAL) *ad libitum*, mantidos 04 animais/gaiola, estando expostos a fotoperíodos de 12/12 h, em sala climatizada (22 °C). O presente estudo já possui autorização do Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEUA) da UFABC para o uso e manuseio de animais de laboratório

em conformidade com as diretrizes do Conselho Nacional para o Controle de Experimentação Animal (CONCEA) - Registro CEUA nº 2511041218. O presente estudo está vinculado a outros projetos maiores do grupo de pesquisa. Todos os reagentes utilizados no desenvolvimento deste projeto de pesquisa serão adquiridos junto a Sigma Aldrich® ou qualidade similar, com grau de pureza analítica de 98%.

3.2. Coleta dos tecidos encefálicos

Os camundongos (cada grupo tratado $n = 5$, grupo controle $n = 3$) serão obtidos pelo Biotério da UFABC, campus Santo André. A aquisição dos animais será realizada em três momentos, com o fornecimento de 6 animais por bimestre, ou seja, um intervalo de tempo adequado de dois meses para coletar os tecidos e realizar os ensaios enzimáticos para cada grupo de animais. Os animais adquiridos serão transferidos para o Biotério do campus São Bernardo do Campo até o início dos experimentos. Os animais serão eutanasiados por deslocamento cervical com o auxílio de uma pinça cirúrgica e submetidos ao procedimento de dissecação do crânio para acessar o encéfalo. Com a exposição do encéfalo, será realizada a coleta rápida, tudo sobre gelo mas evitando o congelamento, das seguintes regiões: pré-frontal, corpo estriado, septum, hipocampo, mesencéfalo, cerebelo e hipotálamo. Todas as amostras serão pesadas, distribuídas individualmente em tubos de centrífugas (1,5mL) devidamente identificadas e congeladas em banho de gelo seco contendo etanol absoluto. Após, as amostras serão armazenadas em freezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posterior preparação do homogeneizado. Este procedimento será realizado em colaboração com ambos os professores do CMCC e CCNH, porém, a aluna será treinada para fazer o procedimento de dissecação que serve para qualquer técnica de molecular.

3.3. Obtenção do homogeneizado dos tecidos

Os ensaios analíticos serão realizados no Laboratório de Pesquisa do grupo de pesquisa na UFABC. O protocolo para a obtenção do homogeneizado será desenvolvido, conforme descrito por Dalilla *et al.*, 1999. Brevemente, no dia do ensaio, os tecidos [porção do encéfalo (corpo estriado, septum, hipocampo, mesencéfalo, cerebelo e hipotálamo)] serão descongelados e homogeneizados em sonificador (Ika®) com tampão gelado 10mM Tris-HCl, pH 7,4 na proporção de 1:50 (w/v), sempre em

banho de gelo. Em seguida, cada amostra será centrifugada a $3000 \times g$ (Eppendorf®) durante 10 min a 4°C. Cada sobrenadante será transferido para novo microtubo de centrífuga (1,5 mL) para o desenvolvimento dos futuros ensaios *in vitro*.

3.4. Dosagem de proteínas do homogeneizado

A concentração de proteínas totais de cada tecido será determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976). A curva padrão para o teste será preparada na proporção de um volume de BSA para 4 volumes de Reagente Bradford (Sigma Aldrich®), nas concentrações de 100 µg/mL (0,1 µg/µL), 50 µg/mL (0,05 µg/µL), 25 µg/mL (0,025 µg/µL) e 12,5 µg/mL (0,0125 µg/µL). Já as amostras serão diluídas 10x ou 50x e utilizadas na proporção de 25 µL de amostra para 100 µL de Reagente Bradford. Em seguida, após 15 min de incubação a temperatura ambiente, as amostras serão submetidas a leitura no espectrofotômetro em luz visível a 595nm. Após os ajustes para a concentração final de 1µg/µL, as amostras serão congeladas por 3 semanas à -80°C até o momento da utilização.

3.5. Ensaios de atividade da enzima colinesterase (ChE) *in vitro*

A avaliação da atividade enzimática da ChE será realizada pelo método de Ellman, com pequenas modificações (Martins *et al.*, 2018; Padilla *et al.*, 1999; Ellman *et al.*, 1961). Os testes de atividade da ChE serão organizados da seguinte forma:

- ✓ **Basal:** diferentes concentrações de proteínas (1, 50, 100 e 200 µg/mL) do homogeneizado de cada região encefálica;
- ✓ **Antipsicótico:** atividade da ChE na presença de diferentes concentrações de Hal;
- ✓ **Controle positivo:** inibição da ChE com *Tetraethyl pyrophosphate* (5 mM).

Brevemente, todas as reações serão realizadas em uma mistura em tampão de fosfato (pH 8,0) contendo as diferentes amostras, iodeto de acetiltiocolina (substrato da colinesterase, 1mmol/L), reagente de Ellman (ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico – DTNB, 1mM) e será incubada a 37 °C por 10 min. A formação do ânion amarelo 5-tio-2- nitrobenzoato será monitorada no comprimento de onda de 412 nm, durante 20 min. Três experimentos independentes serão realizados em triplicata para determinar a

concentração média de hidrólise do substrato e, assim, estimar a atividade da ChE frente ao antipsicótico.

3.6. Efeito do antipsicótico inibidor da ChE selecionado *in vitro* sobre a atividade da ChE *in vivo*

3.6.1. Análise comportamental - Teste de catalepsia

Um dos efeitos secundários dos antipsicóticos é a indução de catatonia em humanos ou catalepsia em roedores. Em humanos esse efeito é prevenido com o uso de anticolinérgicos junto com o antipsicótico (Miller et al., 2005). Porém, a toxicocinética envolvida na catalepsia, pelo uso de antipsicóticos ainda é motivo de muita pesquisa. Com tudo, neste trabalho será considerado fazer o teste de catalepsia para saber se a dose utilizada nos camundongos já induziria este efeito secundário. Também serão utilizadas duas doses sem aparente efeito cataléptico.

Teste de catalepsia: na sala de comportamento motor, laboratório 120 da Neurociência, será avaliado esse comportamento colocando o camundongo com ambas as patas dianteiras em cima de uma barra de vidro (diâmetro 0.5 cm) elevada 4.5 cm acima da mesa (Figura 5). O tempo durante o qual o animal se mantém nesta posição será registrado, com tempo de corte 300 s. Catalepsia é considerada como finalizada quando o camundongo toca o chão pelo menos com uma das patas dianteiras ou em caso de começar a explorar a barra (Echeverry et al., 2007). Esta posição é considerada aberrante, uma vez que o roedor normalmente não fica nesta posição espontaneamente.

3.6.2. Atividade da enzima colinesterase (ChE) *in vivo*

Após a análise comportamental, os animais serão eutanasiados e os tecidos encefálicos serão coletados como descrito no item 3.2. As amostras serão armazenadas em freezer a -80 °C e a preparação do homogeneizado será realizada como apontado no item 3.3.e 3.4. A avaliação da atividade enzimática da ChE será realizada pelo método de Ellman (item 3.5). Os dados obtidos serão expressos por concentração do substrato hidrolisado por tempo de hidrólise em 1 min por peso do de cada região encefálica ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$).



Figura 5: Posição do roedor no teste de catalepsia considerado como um efeito secundário dos antipsicóticos. Será escolhida uma dose cataléptica e outras doses não catalépticas para investigar se os EPS estão associados à inibição da enzima ChE.

3.7. Análise estatística

As análises estatísticas serão realizadas com o auxílio do software Graph Prisma 5.0, utilizando o teste ANOVA de uma via com o pós-teste de Tukey, ou ANOVA de duas vias com o pós-teste de Bonferroni, de acordo com o número de variáveis a serem analisadas.

4. AS PRINCIPAIS FASES DO PROJETO SÃO:

- **Fase 1. Fundamentação teórica:** Caracterização morfofuncional do sistema nervoso central e periférico, descrevendo os principais eventos celulares e moleculares. Ainda, entender como estes eventos caracterizam as principais disfunções neurodegenerativas. Nessa fase, o aluno utilizará livros didáticos utilizados nos cursos de graduação em língua portuguesa e/ou inglesa, indicados pelo orientador, para conhecer os termos científicos e técnicos nessa área de conhecimento;
- **Fase 2. Análises dos bancos de dados bibliográficos:** Orientação das estratégias de buscas nesses bancos [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>; <http://www.scielo.br/>] para selecionar artigos científicos de circulação nacional e internacional de relacionados ao estudo proposto, assim como, acompanhar a evolução da literatura específica ao longo do período de execução do projeto. Essa fase auxiliará a interpretação e discussão dos resultados e fornecerá subsídios científicos e metodológicos para redigir os relatórios no futuro;

- Fase 3. Desenvolvimento do projeto:** Compreende ao maior período do projeto proposto em que o aluno executará as atividades experimentais previstas. Inicialmente, o aluno acompanhará outros alunos ou docentes para desenvolver as habilidades necessárias durante as análises previstas no projeto, levando em consideração os critérios fundamentais inseridos nos procedimentos metodológicos para a obtenção dos resultados, assim como, as prováveis análises estatísticas que validam a hipótese formulada no presente estudo.

5. CRONOGRAMA

Vigência do projeto: **Início:** 01 de agosto de 2022; **Término:** 31 de Julho de 2023.

ATIVIDADES	Meses											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	12	12	12
Aquisição dos animais e Obtenção dos encéfalos: Congelamento dos tecidos (pré-frontal, corpo estriado, septo frontal, hipocampo, mesencéfalo, cerebelo e hipotálamo).												
Preparação dos homogeneizados; Ensaio enzimático da atividade ChE na presença dos antipsicóticos.												
Seleção do antipsicótico de interesse para os ensaios <i>in vivo</i> . Tratamentos dos animais; coleta dos tecidos encefálicos; Congelamento dos tecidos.												
Ensaio enzimático da atividade ChE na presença dos antipsicóticos.												
Integração dos dados obtidos e elaboração da discussão com referência à literatura pesquisada.												
Análise dos bancos de dados; redação dos relatórios previstos.												

6. BIBLIOGRAFIA

Arndt, M.A., et al., The arginine metabolite agmatine protects mitochondrial function and confers resistance to cellular apoptosis. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2009. 296(6): p. C1411-9.

Baldessarini, R.J., and Frankenburg, F.R. Clozapine: A novel antipsychotic agent. *New England Journal of Medicine*, 324:746-754, 1991.

Beasley CM, Jr., Sanger T, Satterlee W, Tollefson G, Tran P, Hamilton S (1996): Olanzapine versus placebo: Results of a double-blind, fixed-dose olanzapine trial. *Psychopharmacology* 124:159–167

Benarroch EE. Effects of acetylcholine in the striatum: Recent insights and therapeutic implications. *Neurology*. 2012 Jul 17;79(3):274–81.

Bonito-Oliva, A., Pallottino, S., Bertran-Gonzalez, J., Girault, J.A., Valjent, E., & Fisone G. Haloperidol promotes mTORC1-dependent phosphorylation of ribosomal protein S6 via dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein of 32 kDa and inhibition of protein phosphatase-1; *Neuropharmacology*; (2013) 72, 197-203.

Bradford, M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976. 72: p. 248-54.

Calabresi P, Picconi B, Tozzi A, Ghiglieri V, Di Filippo M. Direct and indirect pathways of basal ganglia: a critical reappraisal. *Nat Neurosci*. 2014. 17(8): 1022-1030 p.

Chacón, M. A.; Reyes, A. E.; Inestrosa, N. C. Acetylcholinesterase induces neuronal cell loss, astrocyte hypertrophy and behavioral deficits in mammalian hippocampus. *Journal of neurochemistry*, v. 87, n. 1, p. 195–204, 2003.

Choi Y, Jeong HJ, Liu QF, Oh ST1, Koo BS, Kim Y, Chung IW, Kim YS, Jeon S. Clozapine Improves Memory Impairment and Reduces A β Level in the Tg-APPswe/PS1dE9 Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Mol Neurobiol*. 2017 Jan;54(1):450-460. doi: 10.1007/s12035-015-9636-x. Epub 2016 Jan 7.

Chris Smart, Hamish McAllister-Williams, and David Andrew Cousins Acetylcholinesterase inhibitors in treatment-resistant psychotic depression. *Ther Adv Psychopharmacol*. 2018 Jan; 8(1): 59–61. Published online 2017 Jul 10.

Echeverry MB, Salgado ML, Ferreira FR, da Silva CA, and Del Bel EA; Intracerebroventricular administration of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase inhibitors induces catalepsy in mice; *Psychopharmacology*; (2007); 194 271-278

Ellman G.L., Courtney D.K, Andres V., R.M. Featherstone, A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, *Biochem. Pharmacol.* 7 (1961) 88–95.

Emerit, J., M. Edeas, and F. Bricaire, Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2004. 58(1): p. 39-46.

Hals P.A., Hall H., Dahl S.G. . Muscarinic cholinergic and histamine H1 receptor binding of phenothiazine drug metabolites

Hardy, J. A.; Higgins, G. A. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* (New York, N.Y.), v. 256, n. 5054, p. 184–5, 1992.

Hindle, J. V. Ageing, neurodegeneration and Parkinson's disease. *Age and Ageing*, v. 39, n. 2, p. 156–161, 2010.

Ichikawa J, Dai J, O'Laughlin IA, Fowler WL, Meltzer HY. Atypical, but not typical, antipsychotic drugs increase cortical acetylcholine release without an effect in the nucleus accumbens or striatum. *Neuropsychopharmacology*. 2002 Mar;26(3):325-39.

Kaneko S, Hikida T, Watanabe D, Ichinose H, Nagatsu T, Kreitman RJ, et al. Synaptic integration mediated by striatal cholinergic interneurons in basal ganglia function. *Science* (80-). 2000 Jul 28;289(5479):633–7

Keverne J & Ray M. Neurochemistry of Alzheimer's disease. *Psychiatry*, Volume 7, Issue 1, January 2008, Pages 6-8. doi.org/10.1016/j.mppsy.2007.11.006

Krishnan, S.; York, M. K.; Backus, D.; Heyn, P. C. Coping With Caregiver Burnout When Caring for a Person With Neurodegenerative Disease: A Guide for Caregivers. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*, v. 98, n. 4, p. 805–807, 2017..

Lane C.A., Hardy J, Schott J.M. Alzheimer's disease Eur J Neurol, 25 (2018), pp. 59-70

Lee HB, Hanner JA, Yokley JL, Appleby B, Hurowitz L, Lyketsos CG. Clozapine for treatment-resistant agitation in dementia. J Geriatr Psychiatry Neurol. 2007 Sep;20(3):178-82.

Martini F, Bruning CA, Soares SM, Nogueira CW, Zeni G1. Inhibitory effect of ebselen on cerebral acetylcholinesterase activity in vitro: kinetics and reversibility of inhibition. Curr Pharm Des. 2015;21(7):920-4.

Martins NO; de Brito IM. Araújo SSO, Negri G, Carlini, EA, Mendes, FR. Antioxidant, anticholinesterase and antifatigue effects of *Trichilia catigua* (catuaba). BMC Complementary and Alternative Medicine, v. 18, n. 1, p. 172, 2018.

Martins, N.M., et al., Low-molecular-mass peptides from the venom of the Amazonian viper *Bothrops atrox* protect against brain mitochondrial swelling in rat: potential for neuroprotection. Toxicon, 2010. 56(1): p. 86-92.

Miller DD, McEvoy JP, Davis SM, Caroff SN, Saltz BL, Chakos MH, Swartz MS, Keefe RS, Rosenheck RA, Stroup TS, Lieberman JA. Clinical correlates of tardive dyskinesia in schizophrenia: baseline data from the CATIE schizophrenia trial. Schizophr Res. 2005 Dec 1;80(1):33-43. Epub 2005 Sep 19.

Mintzer, J.; Burns, A. Anticholinergic side-effects of drugs in elderly people. Journal of the Royal Society of Medicine, v. 93, n. 9, p. 457–462, 2000.

Padilla S., Lassiter T.L., Hunter D. (1999) Biochemical Measurement of Cholinesterase Activity. In: Harry J., Tilson H.A. (eds) Neurodegeneration Methods and Protocols. Methods in Molecular Medicine™, vol 22. Humana Press.

Peña-ortega, F. Amyloid Beta-Protein and Neural Network Dysfunction. Journal of neurodegenerative diseases, v. 2013, p. 657470, 2013.

Pinton S1, da Rocha JT, Zeni G, Nogueira CW. Organoselenium improves memory decline in mice: involvement of acetylcholinesterase activity. *Neurosci Lett*. 2010 Mar 12;472(1):56-60.

Prieto SG, Silva JCS, de Lima MO, Almeida MC, Echeverry MB. Cross-tolerance between nitric oxide synthase inhibition and atypical antipsychotics modify nicotinamide-adenine-dinucleotide phosphate-diaphorase activity in mouse lateral striatum. *Behav Pharmacol*. 2019 Feb;30(1):67-78. doi: 10.1097/FBP.0000000000000406.

Richelson E., Souder T. Binding of antipsychotic drugs to human brain receptors: focus on newer generation compounds.

Scarr, E. Muscarinic Receptors: Their Roles in Disorders of the Central Nervous System and Potential as Therapeutic Targets. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, v. 18, n. 5, p. 369–379, 2012.

Schallreuter, K. U.; Elwary, S. Hydrogen peroxide regulates the cholinergic signal in a concentration dependent manner. *Life Sciences*, v. 80, n. 24–25, p. 2221–2226, 2007.

Sheikh, S., et al., Neurodegenerative Diseases: Multifactorial Conformational Diseases and Their Therapeutic Interventions. *Journal of Neurodegenerative Diseases*, 2013. 2013: p. 8.

Singh, A., et al., Nimodipine, an L-type calcium channel blocker attenuates mitochondrial dysfunctions to protect against 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced parkinsonism in mice. *Neurochemistry International*.

Skarsfeldt T (1995): Differential effects of repeated administration of novel antipsychotic drugs on the activity of midbrain dopamine neurons in the rat. *Eur J Pharmacol* 281:289–294.

Swerdlow, R.H. and S.M. Khan, The Alzheimer's disease mitochondrial cascade hypothesis: An update. *Experimental Neurology*, 2009. 218(2): p. 308-315.

Swerdlow, R.H., J.M. Burns, and S.M. Khan, The Alzheimer's disease mitochondrial cascade hypothesis: Progress and perspectives. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 2013(0).

Valente de Oliveira G, Lima Gomes PX, Ramos de Araújo FY, Mendes Vasconcelos SM, Nobre Júnior HV, Florenço de Sousa FC, de LucenaDF, Hyphantis TN, Férrer Carvalho A, Silveira Macêdo D. Prevention of haloperidol-induced alterations in brain acetylcholinesterase activity by vitamins B co-administration in a rodent model of tardive dyskinesia. *Metab Brain Dis*. 2013 Mar;28(1):53-9. doi: 10.1007/s11011-012-9345-3. Epub 2012 Oct 25.

Van Laar, V.S. and S.B. Berman, Mitochondrial dynamics in Parkinson's disease. *Experimental Neurology*, 2009. 218(2): p. 247-256.

Vijayraghavan S, Everling S. Neuromodulation of Persistent Activity and Working Memory Circuitry in Primate Prefrontal Cortex by Muscarinic Receptors. *Front Neural Circuits*. 2021 Mar 15;15:648624. doi: 10.3389/fncir.2021.648624. eCollection 2021.

Young CR, Bowers MB Jr, Mazure CM. Management of the adverse effects of clozapine. *Schizophr Bull*. 1998; 24(3):381-90.