

LUCIANA SOUZA ALCÂNTARA JARDIM

**Efeitos da atividade da fosfolipase A₂ nos
receptores dopaminérgicos: implicações
para a esquizofrenia**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Doutor em Ciências

Área de concentração: Fisiopatologia Experimental
Orientador: Prof. Dr. Wagner Farid Gattaz

São Paulo
2005

Essa tese é dedicada a meu querido marido,
Márcio, e a meus pais, Edison e Nice,
com todo o meu amor!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, meu agradecimento todo especial é para Deus, o grande Criador desse órgão tão complexo, que é o cérebro. A Ele agradeço o apoio e cuidado que teve comigo durante todos estes anos.

Ao Prof. Dr. Wagner F. Gattaz, pela orientação e paciência. Pela confiança que depositou em mim, mesmo não sendo da área médica, ou mesmo biológica. Também agradeço pelo apoio que me deu durante o desenvolvimento deste projeto, principalmente nas etapas finais. Foi um aprendizado único. Obrigado.

Ao Márcio, que é um grande presente de Deus em minha vida! Obrigada pelo companheirismo, amizade, cumplicidade, amor e dedicação. Obrigada também pelas palavras nos momentos difíceis dessa caminhada, que só você soube como ninguém, a melhor forma de me confortar e incentivar. Te admiro e amo muito.

Aos meus amados pais, que sempre acreditaram em mim, me incentivaram e proporcionaram todos os meios necessários para que pudesse atingir mais esse objetivo.

À Evelin, pela grande ajuda durante a realização de todo o presente trabalho, desde o ensino de métodos e discussões sobre planejamento e resultados de experimentos, até dicas para confecção da tese. Agradeço também pelo auxílio, juntamente com a Isis, na coleta das amostras junto ao SVOC (Serviço de Verificação de Óbitos da Capital). Você foi uma das pessoas com quem mais me identifiquei nestes últimos anos. Obrigada por sua amizade!

À Isis e à Leda, pelos importantes momentos de discussão, que foram muito importantes para esclarecer algumas questões durante o desenvolvimento do projeto. Também quero agradecer à Leda por cuidar da parte burocrática, que diz respeito às compras e ao funcionamento geral do laboratório. A amizade de vocês é muito especial. Obrigada.

Aos companheiros de laboratório, pela amizade e pelos agradáveis momentos de descontração, principalmente a equipe da neuroquímica: Evelin, Isis, Leda, Amanda, Nádia e Eliza.

Às técnicas Alessandra e Dna. Edivani, por serem tão prestativas e competentes, e pela amizade e carinho.

Aos Drs. Hildeberto e Douglas, por permitirem que acompanhassem alguns atendimentos de pacientes com esquizofrenia, junto ao ambulatório GARPE (Grupo de Atendimento e Reabilitação de Pacientes Esquizofrênicos).

A todos os funcionários do SVOC, que estiveram sempre prontos a prestar todos os auxílios necessários, especialmente ao Dr. Teóclito S. Carvalho, pela enorme colaboração na coleta e avaliação das amostras usadas neste trabalho.

Aos funcionários do IPq e da FMUSP, que estiveram prontos a ajudar no que fosse possível. Em especial à Zelinda, pela grande paciência e competência; à Sônia, Tânia Rosângela e Eliza, por estarem sempre prontas a esclarecerem minhas dúvidas em relação às questões burocráticas; à Dna. Maria Aparecida e Sônia, pela confecção da ficha catalográfica.

A FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo), que foi o órgão responsável pela bolsa e auxílios concedidos, que permitiram a realização deste projeto.

A todos que de alguma forma contribuíram para este trabalho, seja pela amizade ou pela ajuda. Muito Obrigado!

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro de Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2004.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de figuras	
Lista de tabelas	
Lista de siglas e símbolos	
Resumo	
Summary	
1. INTRODUÇÃO	01
2. OBJETIVOS	04
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	05
3.1 Esquizofrenia.....	05
3.1.1 Genética.....	07
3.1.2 Sistemas de neurotransmissão.....	09
3.2 Dopamina em esquizofrenia.....	15
3.2.1 Receptores dopaminérgicos	15
3.2.2 Hipótese dopaminérgica.....	18
3.2.3 Técnicas para a dosagem de receptores dopaminérgicos.....	21
3.2.4 Achados sobre o sistema dopaminérgico em esquizofrenia.....	23
3.3 Metabolismo de fosfolípides em esquizofrenia.....	28
3.3.1 Funções dos fosfolípides de membrana e da fosfolipase A ₂	28
3.3.2 A família de enzimas fosfolipases A ₂	32
3.3.2.1 Propriedades enzimáticas da PLA ₂ GIV	35
3.3.2.2 Propriedades enzimáticas da PLA ₂ GVI	41
3.3.3 Evidências de alterações no metabolismo dos fosfolípides de membrana na esquizofrenia.....	43
3.4 Fosfolipase A ₂ , fosfolípides de membrana e receptores dopaminérgicos.....	48
4. MATERIAL E MÉTODOS	52
4.1 Amostras	52

4.2 Critérios de inclusão e exclusão.....	52
4.3 Coleta das amostras.....	53
4.4 Princípios gerais para a dosagem de receptores dopaminérgicos	54
4.5 Princípios gerais para a determinação da atividade da PLA ₂	55
4.6 Princípios gerais para a determinação da fluidez de membrana	56
4.7 Preparação das amostras de tecido cerebral	57
4.8 Experimentos de padronização dos receptores dopaminérgicos D ₁ e D ₂	58
4.8.1 Procedimento comum a todos os ensaios (curvas de proteína e de saturação, uso de ketanserina)	58
4.8.2 Determinação da concentração de proteína.....	60
4.8.3 Determinação do valor de IC ₅₀ usando ketanserina como inibidor.....	60
4.8.4 Determinação das curvas de saturação.....	61
4.9 Determinação da atividade da PLA ₂	62
4.9.1 Procedimento comum a todos os ensaios (curvas de proteína, substrato PC ¹⁴ C, tempo de incubação, pH, Ca ²⁺ , EDTA, BEL).....	62
4.9.2 Ensaios de otimização da atividade da PLA ₂	64
4.10 Experimentos de estimulação e inibição da atividade da PLA ₂	64
4.11 Preparações de membranas para a determinação de fluidez de membrana	65
4.11.1 Preparação de membranas totais	65
4.11.2 Preparação de membranas sinaptossomais.....	65
4.12 Experimentos de fluidez de membrana (com o uso das sondas DPH e TMA-DPH) ao estimular ou inibir a PLA ₂	66
4.13 Experimentos de dosagem de receptores D ₁ e D ₂ ao estimular ou inibir a PLA ₂ ..	66
4.14 Análise estatística.....	67
5. RESULTADOS.....	68
5.1 Padronização dos ensaios de receptores dopaminérgicos	68
5.1.1 Determinação da melhor concentração de ketanserina para inibir a ligação aos receptores serotoninérgicos (5-HT _{2A}).....	68
5.1.2 Determinação da concentração ótima de proteína	69
5.1.3 Determinação de K _D e B _{max} dos receptores D ₁ e D ₂	71

5.2 Otimização dos experimentos para determinar a atividade da PLA ₂ e verificar quais subtipos estão presentes	75
5.2.1 Experimentos iniciais para a determinação da atividade da PLA ₂ em córtex pré-frontal humano.....	75
5.2.2 Estudos de inibição da PLA ₂ em tecido cerebral de rato	77
5.2.3 Experimentos de determinação da atividade da PLA ₂ em tecido cortical e estriatal humano.....	79
5.3 Estimulação e inibição da PLA ₂ GVI.....	85
5.4 Efeitos da atividade da PLA ₂ GVI na fluidez de membrana: ensaios de padronização.....	87
5.5 Efeitos da atividade da PLA ₂ GVI nos receptores dopaminérgicos.....	89
6. DISCUSSÃO	96
6.1 Padronização dos ensaios de receptores dopaminérgicos	97
6.2 Otimização da atividade da fosfolipase A ₂	103
6.3 Experimentos de fluidez de membrana.....	113
6.4 Efeitos da atividade da PLA ₂ GVI nos receptores dopaminérgicos.....	115
6.5 Limitações do estudo.....	119
6.6 Perspectivas futuras.....	120
7. CONCLUSÕES	122
8. REFERÊNCIAS	123

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição cerebral dos receptores dopaminérgicos:.....	17
Figura 2 – Hipótese do desequilíbrio dopaminérgico mesolímbico-mesocortical.....	20
Figura 3 – Estrutura química dos glicerofosfolípides de membranas celulares.....	30
Figura 4 – PLA ₂ e alguns produtos de sua ação catalítica sobre os fosfolípides de membranas celulares	32
Figura 5 – Representação esquemática do domínio C2 da PLA ₂ GIVA humana.....	37
Figura 6 – Modelo proposto para o mecanismo catalítico da PLA ₂ GIVA	39
Figura 7 – Clivagem do substrato PC ¹⁴ C pela PLA ₂	55
Figura 8 – Curva de competição utilizando ketanserina como inibidor em tecido cortical humano	69
Figura 9 – Dependência de proteína dos ensaios em tecido cortical humano.....	69
Figura 10 – Comparação entre experimentos sem e com a presença de 100 nM de ketanserina.....	70
Figura 11 – Dependência de proteína para receptores D ₁ com ³ H-SCH 23390 em tecido estriatal humano	71
Figura 12 – Dependência de proteína para receptores D ₂ em tecido estriatal humano..	71
Figura 13 – Experimento de saturação para receptores D ₁ em CPF humano	72
Figura 14 – Experimento de saturação para receptores D ₁ em CT humano	73
Figura 15 – Curva de saturação da ligação entre ³ H-Espiperona e receptores D ₂ em tecido cortical humano	73
Figura 16 – Experimento de saturação para receptores D ₁ em estriado humano.....	74
Figura 17 – Experimento de saturação para receptores D ₂ em estriado humano.....	74
Figura 18 – Curva de saturação da ligação entre ³ H-Espiperona e receptores D ₂ em estriado humano	75
Figura 19 – Curva de atividade da PLA ₂ em função do tempo de incubação.....	76

Figura 20 – Curva de atividade da PLA ₂ em função da concentração de Ca ²⁺	76
Figura 21 – Curva de inibição da atividade da PLA ₂ GVI com BEL	78
Figura 22 – Curva de atividade da PLA ₂ em função da concentração de substrato (PC ¹⁴ C) em tecido cortical humano	79
Figura 23 – Curva de atividade da PLA ₂ em função da concentração de proteína em tecido cortical humano	80
Figura 24 – Curva de atividade da PLA ₂ em função do pH em tecido cerebral humano	80/81
Figura 25 – Curva de atividade da PLA ₂ em função da concentração de Ca ²⁺ em estriado humano	82
Figura 26 – Curva de inibição da atividade da PLA ₂ GVI com BEL na presença de Ca ²⁺ 10 μM e de EDTA 1,0 mM.....	83
Figura 27 – Curva de atividade da PLA ₂ em função da concentração de EDTA em tecido cerebral humano	85
Figura 28 – Estimulação e inibição da atividade da PLA ₂ GVI.....	86
Figura 29 – Efeitos da atividade da PLA ₂ GVI nos receptores D ₁ em estriado	90
Figura 30 – Efeitos da atividade da PLA ₂ GVI nos receptores D ₁ em CPF	91
Figura 31 – Efeitos da atividade da PLA ₂ GVI nos receptores D ₁ em CT.....	92
Figura 32 – Efeitos da atividade da PLA ₂ GVI nos receptores D ₂ em estriado	94
Figura 33 – Inibidores de PLA ₂	105
Figura 34 – Cetona reativa para ação inibitória da PLA ₂ GVI	107

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características da fosfolipase A ₂ grupo IV e da fosfolipase A ₂ grupo VI expressas em cérebro humano.....	34
Tabela 2 – Dados <i>post mortem</i> sobre os sujeitos deste estudo.....	54
Tabela 3 – Esquema de pipetagem na placa, onde cada célula corresponde a uma triplicata.....	60
Tabela 4 – Volume de cada composto pipetado em cada poço da placa	61
Tabela 5 – Esquema de pipetagem na placa, com o uso de um inibidor.....	61
Tabela 6 – Volume dos compostos pipetados em cada poço da placa (saturação)	62
Tabela 7 – Esquema de pipetagem para os receptores D ₁ e D ₂ em tecido cortical	67
Tabela 8 – Dados comparativos de atividade da PLA ₂ com o uso de [Ca ²⁺] = 5,0 mM e de [EDTA] = 5,0 mM.....	78
Tabela 9 – Dados comparativos de atividade da PLA ₂ com o uso de [Ca ²⁺] = 10 µM e com o uso de [EDTA] = 1,0 mM	84
Tabela 10 – Valores de anisotropia em membranas sinaptossomais para os diferentes tempos de incubação, com estimulação ou inibição da PLA ₂ antes do ensaio de anisotropia	88
Tabela 11 – Valores de anisotropia em membranas sinaptossomais para os diferentes tempos de incubação, com estimulação ou inibição da PLA ₂ durante o ensaio de anisotropia	88
Tabela 12 – Valores de anisotropia em membranas totais para os diferentes tempos de incubação, com estimulação ou inibição da PLA ₂ antes do ensaio de anisotropia	89
Tabela 13 – Efeitos da PLA ₂ GVI na afinidade de ligação aos receptores D ₁ e D ₂	95
Tabela 14 – Efeitos da PLA ₂ GVI na densidade dos receptores D ₁ e D ₂	95

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

- AA – ácido araquidônico
- AACOCF₃ – araquidonil trifluormetil cetona
- AGE – ácidos graxos essenciais
- AL – ácido linolêico
- AMPA – ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4 lisoxazol propiônico
- ATP – adenosina trifosfato
- AVC – acidente vascular cerebral
- BEL – E-6-(bromometileno)tetrahidro-3-(1-naftalenil)-2H-piran-2-ona
- B_{max} – densidade máxima de receptores
- CaM – calmodulina
- cAMP – adenosina monofosfato cíclica
- CAPPesq – Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
- CID – Classificação Internacional de Doenças
- COMT – catecol-o-metiltransferase
- CPF – córtex pré-frontal
- CPFDL – córtex pré-frontal dorso lateral
- CT – córtex temporal
- [] – concentração
- DA – dopaminérgico (a)
- DHA – ácido docosaheptaenóico
- DOPAC – ácido 3,4-dihidroxifenil acético
- DPH – 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno
- DSM – Manual Diagnóstico e Estatístico dos Distúrbios Mentais
- EDTA – tetra acetato de etilenodiamina
- EGTA – etileno glicol-bis-(b-amino-etil éter)

EPA – ácido eicosapentaenóico
ERR – ensaios rádio-receptores
GABA_A – ácido γ -aminobutírico A
HVA – ácido homovanílico
K_D – constante de equilíbrio de dissociação
lisoPC – lisofosfatidilcolina
MAFP – metil araquidonil fluorofosfonato
MAPK – proteína cinase ativada por mitogênese
MK-801 – diazocilpina
NMDA – N-metil-D-aspartato
OMS – Organização Mundial de Saúde
PACOCF₃ – palmitoil trifluormetil cetona
PAF – fator de ativação de plaquetas
PANSS – Positive And Negative Symptoms Scale
PC – fosfatidilcolina
PC¹⁴C – L- α -1-palmitoil-2-araquidonil-fosfatidilcolina, marcado com ¹⁴C
PCP – fenciclidina
PDE – fosfodiéster
PE – fosfatidiletanolamina
PET – Positron Emission Tomography (tomografia por emissão de pósitron)
PI – fosfatidilinositol
PKC – proteína cinase C
PLA₂ – fosfolipase A₂
PLC – fosfolipase C
PME - fosfomonoéster
(-)-3-PPP – (-)-3-hidroxifenil-N-propilpiperidina
PS – fosfatidilserina
REM – rapid eye moviment
RMN³¹P – ressonância magnética nuclear de fósforo 31
SCH 23390 – (R)-(+)-8 cloro-2,3,4,5-tetrahidro-3-metil-5-fenil-1H-3 benzazepina-7-ol

SEP – sintomas extrapiramidais

SNC – sistema nervoso central

SPET – Single Photon Emission Tomography (tomografia por emissão de fóton único)

SPSS – Statistical Package for Social Sciences

SVOC – Serviço de Verificação de Óbitos da Capital

TMA-DPH – 1-(4-trimetilamoniofenil)-6-fenil-1,3,5-hexatrieno p-toluenosulfonato

RESUMO

Jardim LSA. *Efeitos da fosfolipase A₂ nos receptores dopaminérgicos: implicações para a esquizofrenia* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2005. 143p.

Alterações tanto na neurotransmissão dopaminérgica como no metabolismo de fosfolípidos têm sido implicadas na biologia da esquizofrenia. Fosfolipase A₂ (PLA₂) é uma família de enzimas que possui um papel chave no metabolismo de fosfolípidos no cérebro. Um aumento da atividade da PLA₂ tem sido descrito em tecido cerebral e no sangue (soro, plasma e plaquetas) de pacientes esquizofrênicos. No presente estudo, foram investigados os efeitos da atividade da PLA₂ sobre os receptores dopaminérgicos (D₁ e D₂) em cérebro *post mortem* (córtices pré-frontal e temporal, e estriado) de 10 sujeitos neurologicamente saudáveis. Primeiramente, foram realizados estudos para padronizar os ensaios de receptores dopaminérgicos e para otimizar os experimentos de determinação da atividade da PLA₂. Foi encontrado que o tipo PLA₂GVI é o grupo da enzima predominante nas áreas investigadas, correspondendo a 85 % do total de atividade da PLA₂ detectada no cérebro. Os radioligantes usados foram ³H-SCH 23390 e ³H-Sulpirida para os receptores D₁ e D₂, respectivamente. A estimulação da atividade da PLA₂GVI (induzida por EDTA) aumentou a afinidade dos receptores D₁ em estriado e em córtex pré-frontal e diminuiu a afinidade dos receptores D₂ em estriado. De forma contrária, a inibição seletiva da PLA₂GVI (com o uso de BEL) diminuiu a afinidade dos receptores D₁ em estriado, e nos córtices pré-frontal e temporal, não alterando a afinidade dos receptores D₂ em estriado. A estimulação da PLA₂GVI resultou em aumento na densidade dos receptores D₁ em córtices pré-frontal e temporal, e de receptores D₂ em estriado. A inibição da atividade da PLA₂GVI não alterou a densidade dos receptores D₁ e D₂ nas diferentes regiões estudadas. Esses achados sugerem que uma elevação da PLA₂ em esquizofrenia, como descrito na literatura, poderia contribuir para a biologia da doença através de alterações na neurotransmissão dopaminérgica.

Descritores: 1.FOSFOLIPASES A/análise 2.RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS/análise, 3.ESQUIZOFRENIA/etiologia 4.NEUROQUÍMICA/métodos 5.QUÍMICA CEREBRAL

SUMMARY

Jardim LSA. *Effects of phospholipase A₂ on dopamine receptors: implications to schizophrenia* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2005. 143p.

Alterations in dopaminergic neurotransmission and in phospholipid metabolism have been both implicated in the biology of schizophrenia. Phospholipase A₂ (PLA₂) is a family of enzymes that play a pivotal role in brain phospholipid metabolism. Increased PLA₂ activity has been described in the blood and in post mortem brain tissue from schizophrenic patients. In the present study it was investigated the effects of PLA₂ activity on dopamine receptors (D₁ and D₂) in post mortem brain (prefrontal and temporal cortices, and striatum) of 10 healthy subjects. Firstly the radio-receptors assays were standardised and the PLA₂ assays were optimised to maximise the detection of brain PLA₂ activity. It was found that PLA₂GVI is the predominant enzyme group in the areas investigated, corresponding to 85 % of all PLA₂ activity detected in the brain. Using ³H-SCH 23390 and ³H-Sulpiride as radioligands for D₁ and D₂ receptors, respectively, it was observed that the stimulation of PLA₂GVI activity (EDTA induced) increased D₁ receptors affinity in striatum and in prefrontal cortex, and decreased the D₂ receptors affinity in striatum. Conversely, the selective inhibition of PLA₂GVI (using BEL) decreased D₁ affinity in striatum, prefrontal and temporal cortices, and did not change D₂ affinity in striatum. The stimulation of PLA₂GVI increased D₁ density in prefrontal and in temporal cortices, as well as the D₂ density in striatum. Inhibition of the enzyme did not change D₁ and D₂ densities in the different brain regions investigated. The present results suggest that increased PLA₂ activity in schizophrenia, as described in the literature, may contribute to the biology of the disease through alterations in dopaminergic neurotransmission.

Keywords: 1.PHOSPHOLIPASES A/analyses 2.RECEPTORS DOPAMINE/analyses 3.SCHIZOPHRENIA/etiology 4.NEUROCHEMISTRY/methods 5.BRAIN CHEMISTRY

1 INTRODUÇÃO

Esquizofrenia é uma doença psiquiátrica caracterizada por distorções fundamentais e características do pensamento e da percepção, e por afeto inadequado ou embotado (CID-10 - OMS 1993). Tem início, em geral, na adolescência ou na fase inicial da idade adulta. Esta patologia apresenta diversos aspectos etiopatogênicos, podendo ser genéticos, ambientais, neurodesenvolvimentais, neurodegenerativos, estruturais e bioquímicos. Dentre os aspectos bioquímicos estão as alterações nos sistemas neurotransmissores, sendo o dopaminérgico (DA) o mais estudado.

A hipótese DA tem sido apresentada como um desequilíbrio DA mesolímbico-mesocortical. De acordo com esta hipótese, no cérebro normal os eferentes DAs projetam-se para o córtex pré-frontal (CPF) e provocam um estímulo na transmissão DA nesta região. Este estímulo causa um efeito inibitório na transmissão DA mesolímbica. Em cérebro de esquizofrênicos, supõe-se que a projeção para o CPF esteja prejudicada, o que prejudicaria, também, a estimulação na transmissão DA, seguido de uma queda no efeito inibitório sobre a transmissão mesolímbica. Este fato resultaria em uma hiperatividade DA mesolímbica (correlato dos sintomas positivos da doença). A estimulação no CPF diminuída (hipofrontalidade) seria responsável pelos sintomas negativos e pelo déficit neuropsicológico (Weinberger, 1987; Robbins, 1990).

Além das alterações no sistema DA, a atividade da fosfolipase A₂ (PLA₂) tem sido encontrada alterada em pacientes esquizofrênicos, sugerindo distúrbios no metabolismo dos fosfolípides da membrana celular. A PLA₂ compreende uma série de enzimas extra- e intracelulares, sendo a enzima chave no metabolismo de fosfolípides de membrana. A PLA₂ catalisa a hidrólise de fosfolípides na posição estereoespecificamente numerada 2 (*sn*-2) para produzir ácidos graxos livres, como ácido araquidônico (AA), e lisofosfolípides (Farooqui et al., 1999).

Estudos têm mostrado que a atividade da PLA₂ está aumentada em plasma, soro, plaquetas e em córtex temporal de pacientes esquizofrênicos (Gattaz et al., 1987; 1990 e 1995b; Ross et al., 1999; Lasch et al. 2003; Smesny et al., 2005). Também tem sido descrito um metabolismo desordenado no cérebro de esquizofrênicos através de medidas, *in vivo*, por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de fósforo 31 (RMN-³¹P) (Pettegrew et al., 1991; Stanley et al., 1995; Fukuzako et al., 1999a e b). Todos esses dados sugerem quebra acelerada dos fosfolípides de membrana em esquizofrenia.

Existe uma relação funcional entre o sistema DA, a atividade da PLA₂ e os fosfolípides de membrana: a PLA₂ influencia as propriedades físico-químicas de membranas sinápticas (Farooqui et al., 1992), e modula a liberação de dopamina (Bradford et al., 1983; Ohmichi et al., 1989), assim como a afinidade de receptores D₂ em membranas neuronais (Oliveira et al., 1984). Usando dois diferentes modelos animais de comportamento, mediado por dopamina, foi mostrado que a atividade DA foi inibida pela aplicação intracerebral de PLA₂ (Gattaz & Brunner, 1996). Um estudo mostrou que a exposição crônica a drogas psicoestimulantes deve causar uma inibição

compensatória de PLA₂ em áreas ricas em dopamina (Ross et al., 2002). A lisofosfatidilcolina (lisoPC - produto de quebra pela ação da PLA₂) diminuiu a densidade de receptores D₁ e D₂, em tecido estriatal de rato (Lee et al., 2004). Mais recentemente, um trabalho realizado em rato (Bhattacharjee et al., 2005), também apresentou uma relação entre a atividade da PLA₂ e receptores DAs. Houve aumento na incorporação de AA com o uso de quinpirol (agonista de D₂) em regiões ricas em receptores da família D₂, indicando que esses receptores medeiam a ativação da PLA₂, já que esta é a responsável pela liberação de AA dos fosfolípides de membrana.

Devido à atividade aumentada da PLA₂ possuir um mecanismo que acelera a quebra de fosfolípides de membrana e devido aos estudos sobre a relação entre a atividade da PLA₂ e receptores DAs, neste trabalho foram investigados os efeitos da atividade da PLA₂ (estimulação e inibição) sobre os receptores DAs D₁ e D₂ e sobre a fluidez de membrana em tecido cerebral humano *post mortem*. Primeiramente foram feitos experimentos para padronizar os ensaios rádio-receptores para D₁ e D₂, e experimentos de otimização para a determinação da atividade da PLA₂ nas regiões aqui investigadas (córtices pré-frontal [CPF] e temporal [CT], e estriado). Foi observado que o aumento na atividade da PLA₂ aumentou a afinidade aos receptores D₁ e diminuiu a afinidade aos receptores D₂. Já a inibição da PLA₂ diminuiu a afinidade aos receptores D₁ e não alterou a afinidade aos receptores D₂.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo principal

- Estudar os efeitos da atividade da PLA₂ sobre os receptores D₁ e D₂ e sobre a fluidez de membranas, nos córtices pré-frontal e temporal, e estriado.

2.2 Objetivos secundários

- Encontrar as melhores condições de dosagem dos receptores D₁ e D₂ (K_D e B_{max});
- Identificar o grupo de PLA₂ predominante nas regiões cerebrais estudadas;
- Definir as melhores condições para a determinação da atividade do grupo de PLA₂ encontrado;
- Definir as melhores condições para a determinação da fluidez de membranas ao estimular ou inibir a atividade da PLA₂.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Esquizofrenia

Esquizofrenia é uma doença psiquiátrica caracterizada por distorções fundamentais e características do pensamento e da percepção, e por afeto inadequado ou embotado. A consciência clara e a capacidade intelectual costumam ser mantidas, embora certos déficits cognitivos possam surgir no curso do tempo (CID-10 - OMS 1993). Tem início, em geral, na adolescência ou na fase inicial da idade adulta. Seus sintomas característicos freqüentemente têm sido divididos em duas amplas categorias – sintomas positivos e negativos – com uma terceira categoria, desorganizada, recentemente acrescida, pois análises estatísticas revelaram que esta é uma dimensão independente da categoria de sintomas positivos, na qual estava anteriormente incluída. Os sintomas positivos incluem delírios e alucinações. Os desorganizados incluem fala desorganizada (transtorno do pensamento), comportamento desorganizado e atenção fraca. Os sintomas negativos incluem nível e intensidade restritos de expressão emocional (embotamento afetivo), pensamento e produtividade da fala reduzidos, anedonia e avolição (APA, 2000).

Emil Kraepelin estabeleceu o primeiro critério para esquizofrenia em 1896. Sua classificação separava psicoses maníaco-depressivas das crônicas (hebefrenia, catatonia

e demência paranóide), as quais chamou de “Dementia Praecox” (demência precoce), devido à tendência em iniciar no início da fase adulta e a sua propensão em levar a um estado de deterioração mental (Liddle, 1998). Entretanto, o primeiro a usar o termo demência precoce foi Morel, em 1860, referindo-se à condição caracterizada por comportamento estranho e auto-negligência, com início na juventude, levando à deterioração da função mental (Liddle, 1998).

Em 1911, Eugen Bleuler reorganizou o critério de demência precoce para o nome de esquizofrenia (mente dividida). Dividiu os sintomas em fundamentais (embotamento afetivo, perda de associação, ambivalência e autismo) e acessórios (alucinações e ilusões), considerando a fragmentação das funções psíquicas como fator principal da doença. Além disso, observou que nem todos os casos levavam à deterioração mental progressiva (Liddle, 1998). Bleuler introduziu uma importante mudança no diagnóstico da esquizofrenia ao considerar que nem todos os sintomas teriam que estar presentes para que a doença fosse diagnosticada. Esse conceito levou à idéia da existência de vários tipos de esquizofrenia, e tem influenciado os critérios diagnósticos atuais (DSM-IV e CID-10) (APA, 2000). Tanto Bleuler quanto Kraepelin já estavam convencidos de que fatores biológicos estavam envolvidos na esquizofrenia.

Em 1942, Kurt Schneider descreveu a primeira lista de sintomas para a esquizofrenia, dando mais ênfase para as percepções ilusórias, halucinações e distúrbios do pensamento (Liddle, 1998).

A esquizofrenia apresenta diversos aspectos etiopatogênicos, podendo ser genéticos, ambientais, neurodesenvolvimentais, neurodegenerativos, estruturais e

bioquímicos. Dentre os aspectos bioquímicos estão as alterações nos sistemas neurotransmissores, sendo o dopaminérgico o mais discutido. Outros neurotransmissores que também vêm sendo associados à esquizofrenia são: serotonina, glutamato, ácido γ -aminobutírico (GABA), noradrenalina, e acetilcolina, sendo que todos apresentam uma relação com o sistema DA (Bressan e Pilowsky, 2003; Wong e Van Tol, 2003).

Diferentes abordagens científicas, como estudos psicofarmacológicos, genéticos, *post mortem*, de neuroimagem, com modelos animais, e neuroendocrinológicos, têm sido utilizadas na investigação da esquizofrenia. Todavia, a etiologia e a fisiopatologia dessa síndrome ainda são objetos de muito estudo para serem melhor compreendidos e esclarecidos a fim de alcançar tratamentos mais eficazes, e até mesmo conseguir formas de preveni-la.

3.1.1 Genética

Estudos com gêmeos, crianças adotadas, e famílias que tem algum membro esquizofrênico, têm proposto haver um componente genético significativo relacionado à esquizofrenia, além de fatores culturais e ambientais. Estes estudos apontam riscos maiores de desenvolver a doença em parentes de primeiro grau de esquizofrênicos (5-15 % de probabilidade) e concordância de 30-50 % em gêmeos monozigóticos. Já em estudos de adoção, em que os pais biológicos eram esquizofrênicos, foi verificada uma certa influência dos fatores ambientais, sendo que as crianças adotadas teriam menores chances em desenvolver a doença do que se estivessem com seus pais biológicos e, além

disso, foi observado também que há alguns fatores que já são inerentes à vulnerabilidade para a esquizofrenia (Wong e Van Tol, 2003).

Muitas anormalidades, tanto na expressão de mRNA quanto na de proteína, têm sido observadas em estudos *post mortem* em cérebro de esquizofrênicos. Dos genes estudados incluem-se aqueles envolvidos em função sináptica, em sistemas neurotransmissores, e em neurodesenvolvimento. Os genes envolvidos na plasticidade sináptica, no desenvolvimento neuronal, na neurotransmissão e na transdução de sinal, apresentaram-se alterados nos níveis de expressão gênica (Mirnics et al., 2000; Hakak et al., 2001). Entretanto, deve-se considerar a complexidade da regulação gênica, a qual pode ser influenciada por diversos fatores, sendo que um deles diz respeito a estudos que mostram que genes dos sistemas neurotransmissores, especialmente o DA, são particularmente vulneráveis aos efeitos do tratamento antipsicótico (Wong e Van Tol, 2003). Ainda com relação ao sistema DA, além do envolvimento de seus receptores como um alvo terapêutico na esquizofrenia, estudos genéticos têm sugerido uma ligação entre a esquizofrenia e os genes dos receptores ou dos transportadores DAs (Coon et al., 1994; Perisco et al., 1995). Além disso, uma variação no gene COMT (catecol-o-metiltransferase) tem sido descrita como estando associada a um risco aumentado na esquizofrenia (Edgan et al., 2001). O gene COMT está localizado na região do cromossomo 22q11-13, na qual foram descritas conexões com psicoses (como a esquizofrenia). Dentre os cromossomos que têm sido associados à esquizofrenia e a outras psicoses estão: 5q, 11q, 18q, 19q e 22q (Wong e Van Tol, 2003). Todavia, é difícil determinar se as mudanças na expressão gênica são um fator primário da doença,

ou resultado do tratamento antipsicótico, ou ainda um efeito secundário da principal patofisiologia da esquizofrenia.

3.1.2 Sistemas de neurotransmissão

a) Sistema serotoninérgico

Densidade cortical diminuída de receptores serotoninérgicos 5-HT_{2A} e aumento de 5-HT_{1A} têm sido descritos na esquizofrenia (Burnet et al. 1997; Harrison, 1999), enquanto que 5-HT₆ foi encontrado inalterado (East et al., 2002). Os receptores 5-HT_{2A} são bloqueados por alguns antipsicóticos atípicos, onde a risperidona foi o primeiro com uma ação antagonista combinada para receptores 5-HT_{2A} e D₂. Em doses menores (< 6,0 mg/kg) produz um efeito atípico, mas em doses altas produz um aumento dos sintomas extrapiramidais (SEP) dose-dependente, provavelmente devido à alta afinidade a D₂. O bloqueio de 5-HT_{2A} concomitante a um bloqueio menor de D₂ parece reduzir tais efeitos colaterais (Gerlach, 1991). Outro estudo, também com risperidona, em cérebro humano *in vivo*, usando “Positron Emission Tomography” (PET) com ¹¹C-N-metilespiperona, indicou uma ocupação de 5-HT_{2A} no neocórtex de 60 % (Nyberg et al., 1993). Com clozapina, a ocupação de 5-HT_{2A} foi bem maior (84 – 94 %) em pacientes com esquizofrenia, demonstrando a alta afinidade da clozapina por estes receptores (Farde et al., 1994; Nordstrom et al., 1995).

O mecanismo pelo qual o bloqueio de 5-HT_{2A} deve reduzir SEP ainda não é claro. Todavia, tem sido mostrado que o sistema serotoninérgico atua na inibição da função DA no mesencéfalo e no córtex frontal (Kapur e Remington, 1996). Essa

modulação serotoninérgica sobre a função DA apresenta uma evidência clara através de estudos *in vivo*, em macacos, usando PET. O uso de altanserina (antagonista de 5-HT₂) aumenta a liberação de dopamina endógena, enquanto citalopram (inibidor seletivo de recaptação de serotonina) diminui a liberação de dopamina endógena (Dewey et al., 1995). Consistente com a influência inibitória da serotonina sobre a dopamina, ao lesionar as projeções serotoninérgicas, há uma desinibição no sistema DA, causando um aumento nos níveis estriatais de dopamina (Dray et al., 1978). Similarmente, antagonistas de 5-HT₂ bloqueiam a ação inibitória serotoninérgica sobre a dopamina estriatal, resultando em um aumento nos níveis DAs nesta região (Dewey et al., 1995). Há evidências similares para o controle estriatal da função DA límbica e cortical (Ashby et al., 1990; Hamon et al., 1990), porém, deve-se considerar que a serotonina tem uma influência direta sobre os sistemas colinérgico e GABAérgico. Assim, alguns efeitos da serotonina sobre o sistema DA podem ser mediados, indiretamente, através de sua modulação por estes dois outros sistemas (Kapur e Remington, 1996).

b) Sistema glutamatérgico

É o principal sistema neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central (SNC) humano, distribuindo-se na maior parte de suas estruturas. Está envolvido em funções cognitivas fundamentais como memória e aprendizado (Bressan e Pilowsky, 2003). Também influencia a formação da sinapse e a plasticidade sináptica. Seu mau funcionamento afeta a neuroplasticidade e pode causar toxicidade neuronal. Na esquizofrenia, muitos processos regulados por glutamato parecem estar prejudicados, (Konradi e Heckers, 2003).

A hipótese glutamatérgica aponta para uma hipoatividade dos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) na esquizofrenia. O primeiro estudo, feito por Kim e colaboradores (1980), sugere que pacientes esquizofrênicos apresentam uma diminuição na concentração de glutamato no líquido céfalo-raquidiano. A fonte de evidências mais substancial do envolvimento de receptores NMDA na esquizofrenia está relacionada aos efeitos da feniciclidina (PCP – antagonista de NMDA), que a princípio era um anestésico dissociativo, mas depois passou a ser usada como droga de abuso, e seus usuários acabam desenvolvendo sintomas psicóticos semelhantes aos da esquizofrenia (Bressan e Pilowsky, 2003). Isto ocorre devido ao bloqueio dos receptores NMDA. A administração de antagonistas de NMDA a pacientes esquizofrênicos exacerba o quadro psicótico (Konradi e Heckers, 2003).

As vias neuronais envolvidas no modelo NMDA da esquizofrenia estão possivelmente integradas com as vias do modelo DA, pois ambos os sistemas têm uma grande interação no SNC (Bressan e Pilowsky, 2003; Konradi e Heckers, 2003). Os neurônios DAs na substância negra e na área tegmentar ventral recebem “inputs” glutamatérgicos, e o glutamato estimula a atividade DA. Por sua vez, o sistema glutamatérgico é inibido pela dopamina e facilitado pela inibição dos receptores D₂, os quais, sobre as fibras glutamatérgicas na área tegmentar ventral, inibem a liberação de glutamato, enquanto os antagonistas de D₂ revertem esta inibição. Os receptores D₂ também reduzem a atividade mediada pelo receptor glutamatérgico nas vias corticoestriatal e talamoestriatal, enquanto seus antagonistas aumentam a atividade. Estes dados indicam que a modulação do sistema DA por antipsicóticos influencia a performance do sistema glutamatérgico (Konradi e Heckers, 2003).

c) Sistema GABAérgico

A hipótese GABAérgica na esquizofrenia aponta para um defeito nos mecanismos inibitórios GABAérgicos, fato que é consistente com uma redução significativa dos interneurônios GABAérgicos nas camadas II, III, V e VI do cíngulo anterior *post mortem* de sujeitos esquizofrênicos (Benes et al., 1992; Deutsch et al., 2001). Além disso, há dados bioquímicos que suportam os mecanismos inibitórios defeituosos na esquizofrenia: densidade cortical reduzida de sítios de recaptção para ^3H -GABA e redução na ligação do ^3H -ácido nípecótico (um marcador do sítio de recaptção GABAérgico Na^+ -dependente) nas estruturas do lobo temporal medial e dos gânglios basais; e atividade e níveis de mRNA reduzidos para glutamato descarboxilase, a enzima responsável pela produção de GABA (Simpson et al., 1989 e 1992; Benes et al., 1992). Estes dados são consistentes tanto com a perda de neurônios GABAérgicos quanto com a biosíntese de GABA diminuída. Além disso, a densidade de sítios de ligação ao receptor GABA_A no cérebro de esquizofrênicos tem sido interpretada como uma hiper regulação compensatória em resposta a um “input” e estimulação GABAérgica diminuída (Deutsch et al., 2001).

Têm sido sugeridas mudanças na interação entre os sistemas DA e GABAérgico no estriado em esquizofrenia. Esta hipótese está baseada em uma série de observações experimentais que sugerem que a interação entre neurônios DAs e GABAérgicos é fundamental para manter a homeostase funcional, particularmente no estriado (Carlsson et al., 1997; Dean e Hussain, 2001).

d) Sistema colinérgico

Estudos do sono e endocrinológicos sugerem um tônus colinérgico aumentado na esquizofrenia. Em estudos do sono, pacientes esquizofrênicos apresentaram latência REM (rapid eye movement) reduzida, que tem sido atribuída a uma super sensibilidade muscarínica (Riemann et al., 1994). Estudos endocrinológicos em esquizofrênicos apresentaram uma resposta maior ao hormônio de crescimento para piridostigmina, também um inibidor de colinesterase, sugerindo maior tônus colinérgico (O'Keane et al., 1994). Em pacientes não medicados, biperideno, um agente colinérgico comumente utilizado, leva a diminuições significativas nos sintomas negativos e a aumentos significativos nos sintomas positivos (Tandon et al., 1992). Tais achados foram interpretados como que refletindo maior atividade colinérgica na esquizofrenia. Os sistemas DA e colinérgico interagem direta e indiretamente no estriado e no córtex. Têm-se encontrado receptores muscarínicos funcionais em neurônios DAs. Na substância negra, as fibras colinérgicas têm contacto sináptico com neurônios DAs. Similarmente, tem-se sugerido que as células DAs na área tegmentar ventral têm receptores muscarínicos funcionais e que a ativação deles estimula a liberação de dopamina. Em sinaptossomas, a acetilcolina potencializa a liberação de dopamina (Raedler et al., 2003). Em um estudo de PET em voluntários, a aplicação de antagonistas muscarínicos resultou em um aumento da liberação estriatal de dopamina (Dean et al., 1996).

e) Sistema noradrenérgico

O sistema noradrenérgico central atua como uma função global de modulação neural, controle de viglância, do ciclo sono-vigília, e contribui para os processos de aprendizado e memória (Aston-Jones et al., 1991). Há um postulado acerca da hiperatividade noradrenérgica na esquizofrenia, o qual é suportado por uma série de observações. Concentrações elevadas de noradrenalina (NA) têm sido detectadas em tecido cerebral *post mortem* de sujeitos esquizofrênicos comparado a controles (Farley et al., 1978; Bird et al., 1979). Tem sido descrito, também, um aumento de NA no fluido cerebrospinal de esquizofrênicos comparado a controles (Lake et al., 1980; Van Kammen et al., 1989). Além disso, têm sido observadas concentrações acima do normal de NA em plasma de sujeitos esquizofrênicos sem o uso de medicamentos e naqueles tratados com neurolépticos (Dajas et al., 1983; Kemali et al., 1982).

Níveis moderados de NA aumentam as funções do CPF através da ação, pós-sináptica, de adrenoceptores α_{2A} , enquanto níveis altos de NA, por exemplo durante stress, prejudica as funções do CPF através da ação dos adrenoceptores α_1 (Arnsten, 2004). Estudos têm mostrado que agonistas de adrenoceptores α_2 , como clonidina, guanfacina ou medetomidina, melhoram a performance em ratos e macacos, em relação à memória de trabalho (Arnsten 1997; Mao et al., 1999). Estudos em humanos, com a guanfacina, têm apresentado resultados satisfatórios em melhorar funções do CPF, com efeitos colaterais menores, de modo similar aos estudos em animais. Essa droga melhorou a memória de trabalho, planejamento e funções associadas ao aprendizado (Jakala et al., 1999a e 1999b). Acerca dos receptores α_1 , a ativação desses receptores

prejudica acentuadamente a função cognitiva do CPF, o que é induzido durante exposição a um stress intenso. Esse estado de stress pode exacerbar ou precipitar sintomas da esquizofrenia. Isto acontece porque a NA tem menor afinidade aos receptores α_1 em relação a α_2 e, durante stress intenso, os níveis de NA aumentam, favorecendo assim, sua ligação aos receptores α_1 . Isto poderia estar contribuindo para a piora na desordem do pensamento e na deterioração cognitiva em pacientes esquizofrênicos que foram expostos a um stress intenso (Arnsten, 2004).

Há ainda estudos em animais evidenciando que a NA regula comportamentos induzidos por dopamina (Mason, 1981; Plaznik et al., 1982), o que provê uma ligação potencial entre a NA e a disfunção DA na esquizofrenia.

3.2 Dopamina em esquizofrenia

3.2.1 Receptores dopaminérgicos

Os receptores DAs podem ser divididos em duas famílias: família D_1 (D_1 e D_5) e D_2 (D_2 , D_3 e D_4), baseado em similaridades estruturais e farmacológicas (Meador-Woodruff, 1999). Cada receptor apresenta diferentes isoformas, como por exemplo, D_{21} e D_{2s} para D_2 (Wong et al., 2000), e também uma função diferente. Os receptores D_1 , através do acoplamento à proteína G_s (porção excitatória da proteína G), estão envolvidos na estimulação da fosfolipase C (PLC), da adenilato ciclase e da síntese de adenosina monofosfato cíclica (cAMP); na produção de fosfato inositol; mobilização de Ca^{2+} (cálcio); inibição da bomba de Na^+/K^+ -ATPase; ativação da liberação de AA e

estimulação do efluxo de K^+ (potássio). Tem-se sugerido que o receptor D_5 também está envolvido na modulação da função hipotalâmica e em algumas formas de controle motor, além de interagir funcionalmente com receptores $GABA_A$. Receptores da família D_2 , através de acoplamento à proteína G_i (porção inibitória da proteína G), inibem adenilato ciclase e, conseqüentemente, a síntese de cAMP; modulam a hidrólise de fosfoinositídeo; regulam a atividade de diferentes canais iônicos e correntes de K^+ ; ativam a proteína cinase ativada por mitogênese (MAPK) e, em sinergismo com os receptores D_1 , causam inibição de Na^+/K^+ -ATPase e ativação da liberação de AA (Cravchik e Goldman, 2000; Sidhu e Niznik, 2000;). Os receptores também diferem em suas distribuições anatômicas, conforme pode ser observado acerca dos mRNA referentes aos cinco receptores DAs (Figura 1). O subtipo D_1 é o receptor DA mais abundante no cérebro humano, presente em altas densidades em regiões neocorticais, límbicas e nos gânglios basais (Hall et al., 1994). D_5 está presente em maior densidade no hipocampo e hipotálamo, e em menor densidade no estriado (Sibley e Monsma, 1992). O segundo subtipo mais abundante em cérebro humano é o D_2 (Hall et al., 1994). Há alta densidade destes receptores nos gânglios basais, e também estão presentes em regiões extraestriatais, porém em menor densidade (Jaber et al., 1996; Agranoff et al., 1999). O subtipo D_3 é expresso predominantemente em áreas límbicas, incluindo tubérculo olfatório, núcleo accumbens, ilhas Calleja e hipotálamo. Já D_4 é altamente expresso no córtex frontal, mesencéfalo, amígdala, medula e hipotálamo, com níveis menores no estriado e tubérculo olfatório (Sibley e Monsma, 1992).

Enfim, as principais vias DAs são a nigroestriatal, a mesocorticolímbica e a tuberoinfundibular (Cravchick e Goldman, 2000). Os neurônios DAs nigroestriatais

projetam-se da substância negra (A9) para o estriado e estão envolvidos, primariamente, no controle da atividade motora. Os neurônios DAs mesolímbicos projetam-se da área tegmentar ventral (A10) e campo retrorubral (A8) para o núcleo accumbens, tubérculo olfatório, septo e amígdala. Os mesocorticais projetam-se de A10 e A8 para os córtices frontal, entorrinal e piriforme, e cíngulo anterior. O sistema mesocorticolímbico possui um importante papel na regulação da função emocional e cognitiva. Por fim, os tuberoinfundibulares originam-se no hipotálamo e projetam-se para a glândula pituitária, estando envolvidos no controle endócrino (Wilson et al., 1998).

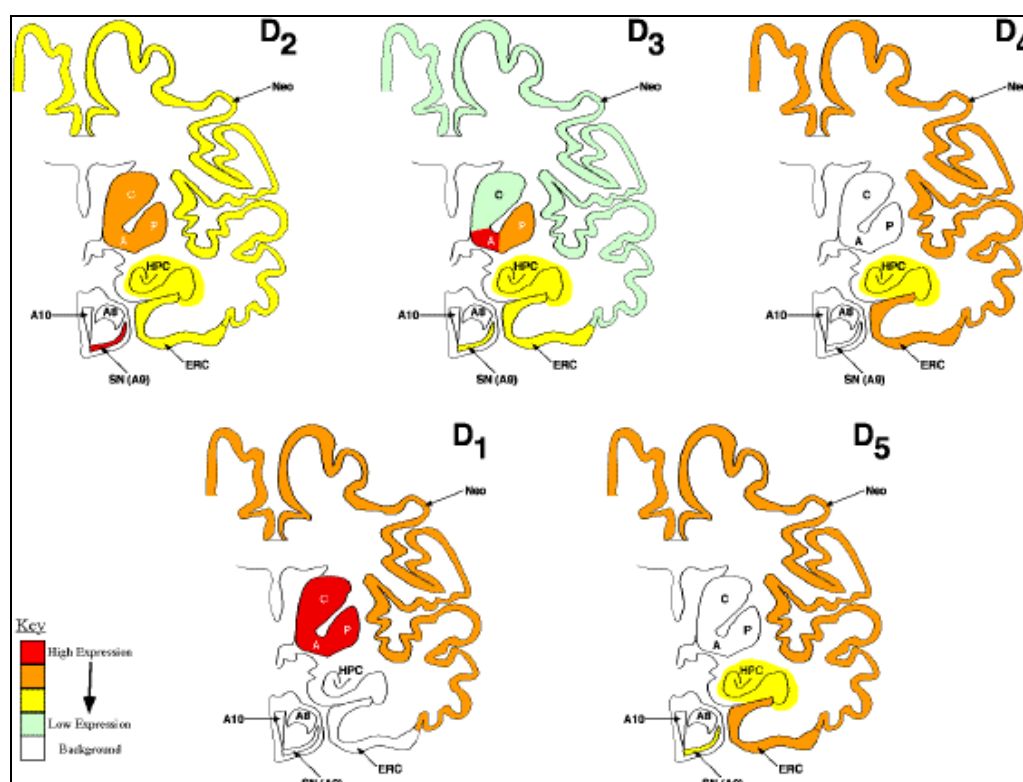


Figura 1*: Distribuição cerebral dos receptores dopaminérgicos. Resumo da distribuição dos transcripts que encodam os mRNA dos receptores DAs em cérebro humano normal. A quantidade relativa a cada mRNA está marcada conforme a cor. A – núcleo accumbens; C – caudado; P – putamen; HPC – hipocampo; ERC – córtex entorrinal; Neo – neocórtex; A8 – campo retrorubral; SN(A9) – substância negra pars compacta; A10 – área tegmentar ventral. * Fonte da Figura: Singer, 2002

3.2.2 Hipótese dopaminérgica

A hipótese DA na esquizofrenia, que aponta para a hiperatividade DA nas vias mesolímbicas como sendo responsável pelos sintomas psicóticos, repousa em uma série de evidências. Os receptores DAs (com destaque para D₂) são o principal alvo dos antipsicóticos típicos, os quais têm sido mais efetivos em reduzir os sintomas positivos (Creese et al., 1976; Seeman, 1987), e há também uma correlação direta entre a potência clínica e a afinidade de D₂, o que não é observado para sistemas de receptores serotoninérgicos, histaminérgicos, muscarínicos ou adrenérgicos (Perouka, 1980). Anfetamina e cocaína induzem a estados psicóticos semelhantes à esquizofrenia, e isto ocorre porque tais drogas estimulam a atividade DA, pois aumentam os níveis sinápticos de dopamina. A cocaína inibe um transportador de dopamina responsável por remover a dopamina liberada na sinapse, e a anfetamina aumenta a liberação de dopamina (Kegeles 1999 e 2000). Estes achados explicam a relação entre aumento de dopamina e os sintomas positivos da doença. Todavia, a hipótese hiperdopaminérgica, nesta forma simples, não explica os sintomas negativos e deficitários, que têm sido normalmente relacionados com um prejuízo da função do lobo frontal (hipofrontalidade) (Davis et al., 1991; Friedman et al., 1999). Assim, integrando ambos aspectos acima, a hipótese DA vêm sendo melhor apresentada como um desequilíbrio DA mesolímbico-mesocortical. Esta hipótese postula uma atividade DA subcortical excessiva (causando os sintomas positivos) e uma baixa atividade DA no CPF (causando os sintomas negativos). A hipoatividade cortical deve levar a hiperatividade subcortical, já que no funcionamento cerebral normal, a atividade DA cortical exerce uma influência inibitória sobre a

atividade DA subcortical (Weinberger, 1987; Robbins, 1990). Assim, essa hipótese engloba tanto fatores da hiperatividade quanto da hipoatividade DA.

Um estudo em ratos (Pycock et al., 1980) reproduziu bem esta interação entre os circuitos mesocortical e mesolímbico. Após destruir seletivamente os aferentes DAs no CPF, houve o desenvolvimento de hiperatividade DA subcortical crônica. Os resultados incluíram aumento no “turnover” de dopamina e hiper regulação de receptores pós-sinápticos. Este experimento sugere que os neurônios DAs mesocorticais afetam os neurônios do CPF, os quais exercem um controle de “feedback” inibitório sobre a atividade DA mesolímbica. Havendo uma situação análoga em humanos, então uma lesão que afete as projeções DAs pré-frontais e/ ou suas conexões, poderia resultar tanto em uma hipoatividade DA mesocortical, como em uma hiperatividade mesolímbica (Figura 2) (Weinberger, 1987; Robbins, 1990).

Enfim, é improvável que a anormalidade DA na esquizofrenia seja exclusiva (outros sistemas de neurotransmissores também estão envolvidos). Todavia, o distúrbio DA é provavelmente um estado de anormalidade fundamental nesta patologia.

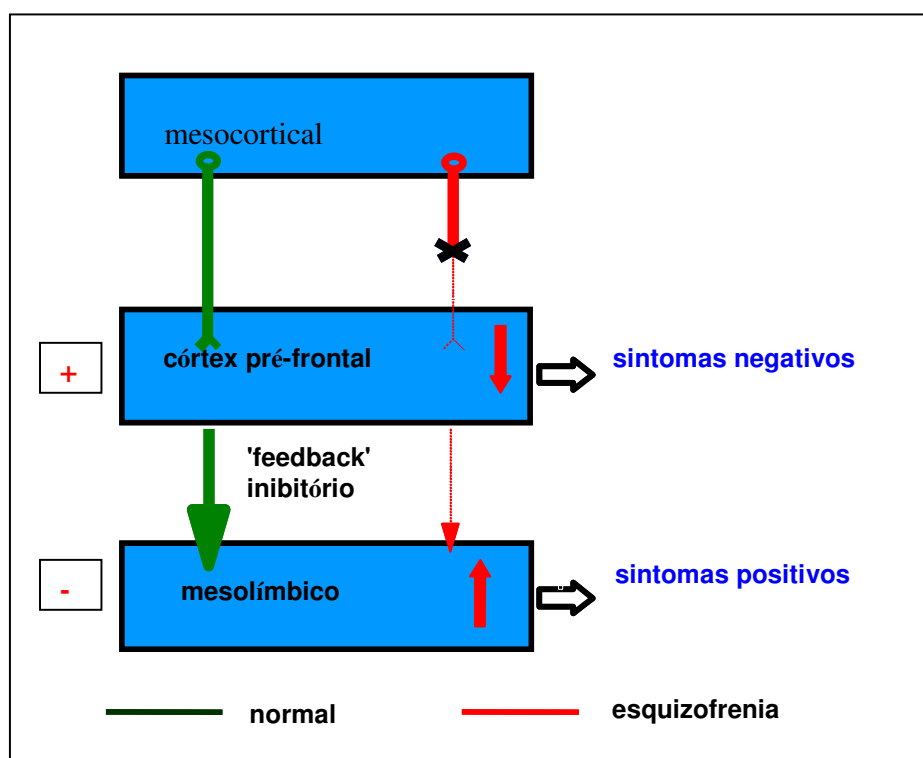


Figura 2: Hipótese do desequilíbrio dopaminérgico mesolímbico-mesocortical. Normal → transmissão DA é estimulada no CPF, causando um efeito inibitório no sistema mesolímbico; esquizofrenia → falha no estímulo da transmissão DA no CPF, prejudicando o efeito inibitório no sistema mesolímbico, levando a hiperatividade DA neste sistema.

Resumindo, há uma série de estudos mostrando alterações em vários sistemas de neurotransmissão na esquizofrenia: desequilíbrio DA mesolímbico-mesocortical, onde há hiperatividade DA mesolímbica e hipoatividade cortical (Weinberger, 1987); densidade diminuída de receptores 5-HT_{2A} e aumentada de receptores 5-HT_{1A} (Burnet et al, 1997; Harrison, 1999); hipoatividade dos receptores NMDA (Bressan e Pilowsky, 2003); defeito nos mecanismos inibitórios GABAérgicos (Deutsch et al., 2001); maior atividade colinérgica (Riemann et al., 1994); hiperatividade noradrenérgica (Arnsten, 2004). Além disso, pode-se dizer também que o sistema DA interage direta ou indiretamente com esses sistemas: tem sua função inibida pelo sistema serotoninérgico

no mesencéfalo e no córtex frontal (Kapur e Remington, 1996); inibe o sistema glutamatérgico, o qual passa a ser facilitado através da inibição dos receptores D₂ (Konradi e Heckers, 2003); sua interação com o sistema GABAérgico é fundamental para manter a homeostase funcional (Carlsson et al., 1997; Dean e Hussain, 2001); a acetilcolina potencializa a liberação de dopamina em sinaptossomas (Raedler et al., 2003); e a NA regula comportamentos induzidos por dopamina (Mason, 1981; Plaznik et al., 1982).

Assim, o mais provável é que na esquizofrenia ocorra um desequilíbrio funcional entre os vários sistemas de neurotransmissão, dentre os quais, o sistema DA parece ocupar papel de destaque.

3.2.3 Técnicas para a dosagem de receptores

Ao longo dos anos vêm sendo realizados uma série de estudos de ligação a receptores em esquizofrenia (Knable et al., 1996; Bowden et al., 1997; Okubo et al., 1997). Os objetivos destes estudos são: comparar a densidade de receptores em cérebro de sujeitos controles e de pacientes esquizofrênicos, observar a ação dos diferentes antipsicóticos segundo a afinidade desses aos respectivos receptores e observar a relação entre os efeitos colaterais e a interação dos antipsicóticos aos receptores (Bigliani e Pilowsky, 1999; Fior, 1999). Tais estudos vêm sendo realizados em tecido cerebral *post mortem* de humanos (Knable et al., 1996; Tang et al., 1997), e de animais como rato (Hall e Wedel, 1986; Millan et al., 1997) e macaco (Köler e Radesäter, 1986); e também há estudos de neuroimagem em humanos *in vivo*, com o uso de PET (“Positron Emission

Tomography”) e SPET (“Single Photon Emission Tomography”) (Okubo et al., 1997; Pilowsky et al, 1997; Bressan et al., 2003).

Os receptores podem ser estudados através de ensaios rádio-receptores (ERR), viabilizando a dosagem específica de um determinado receptor. As duas maneiras mais usadas para realizar os ensaios *in vitro* são a radioautografia quantitativa em fatias de tecido, e preparações de homogenatos de membranas, cuja principal forma de separação do complexo receptor-ligante radioativo formado (RL*) é a filtração, através de papéis de filtro de fibra de vidro. Os ensaios *in vivo* são feitos através de técnicas de PET e SPET. O princípio do ERR é realizar a ligação de um ligante radioativo que apresente alta afinidade pelo sítio de ligação do receptor que estiver sendo investigado, sendo que as medidas *in vivo* envolvem a produção e a incorporação de um radioisótopo em uma molécula de interesse biológico, para então formar um rádio-traçador que pode ser administrado ao homem (Molinoff et al., 1999; Bigliani et al., 1999). Para os receptores dopaminérgicos, os radioligantes mais utilizados nos estudos *in vitro* são: ³H-SCH 23390 para D₁, ³H-Espiperona e ³H-Sulpirida para D₂, ³H-PD 128907 para D₃, a diferença entre ³H-Nemonaprida (específico para D₂, D₃ e D₄) e ³H-Racloprida (específico para D₂ e D₃) para D₄. Até o momento não foi encontrado um radioligante específico para o receptor D₅ (Jaber et al., 1996; Tang et al., 1997). Nos estudos *in vivo*, costuma-se usar: ¹¹C-SCH 23390 (D₁); ¹¹C-racloprida e ¹¹C-metil-espiperona (D₂/ D₃), para PET, e ¹²³I-iodobenzamida e ¹²³I-epideprida (D₂/ D₃), para SPET (Bigliani e Pilowsky, 1999), podendo utilizar também outros isótopos, como ¹⁵O (oxigênio), ¹⁸F (flúor) e ^{99m}Tc (tecnécio) (Grasby et al., 1996). Há algumas pré-condições para a realização do ERR: (1) a ligação receptor-radioligante deve ser reversível; (2) deve

haver saturabilidade na ligação ao receptor; (3) a afinidade do ligante pelo receptor deve ser alta (Laduron, 1984). Antes de realizar este ensaio, há alguns parâmetros que devem ser considerados, tais como o pH do tampão de incubação; a composição iônica do tampão de incubação; temperatura e tempo de incubação; pressão osmótica; espessura do papel de filtro; tempo e número de lavagens durante a separação do complexo RL* (Fior, 1999). Para as medidas *in vivo*, também é necessário que: o radioligante seja capaz de atravessar facilmente a barreira hemato-encefálica, haja uma rápida liberação sanguínea do traçador, metabólitos que não interfiram com a ligação no sítio sob investigação, ausência de efeitos clínicos em doses de saturação ao receptor (Kerwin e Pilowsky, 1995).

Enfim, as técnicas de neuroimagem *in vivo* provêm formas de testar processos dinâmicos, de modo não invasivo, observando-os e quantificando-os no cérebro de sujeitos esquizofrênicos e controles. Também melhoram a visualização de receptores em algumas regiões cerebrais (Bigliani e Pilowsky, 1999). Entretanto, há necessidade de desenvolver e testar novos ligantes mais específicos para os diferentes receptores, além de realizar estudos de correlação entre receptores e outros agentes (como PLA₂) que possam estar alterados em doenças como a esquizofrenia. Estes são alguns dos motivos pelos quais as técnicas de dosagem de receptores *in vitro* ainda são imprescindíveis.

3.2.4 Achados sobre o sistema dopaminérgico em esquizofrenia

Estudos de imagem com PET e SPET, medindo a liberação de dopamina induzida por anfetamina, mostraram um aumento na liberação de dopamina em pacientes esquizofrênicos em relação a controles saudáveis (Abi-Dargham et al., 1998;

Laruelle et al., 1999). Esses dados são consistentes com uma resposta exagerada que revela uma desregulação no sistema DA estriatal em esquizofrenia. Entretanto, esses estudos usaram um agente não fisiológico (anfetamina) e, assim, não forneceram informação sobre níveis basais de dopamina sináptica na ausência de intervenções farmacológicas. Um estudo de SPET (Abi-Dargham et al., 2000) mediu a ocupação dos receptores D₂ estriatais por dopamina, a nível basal e após queda de dopamina (induzida pela administração de α -metil-*para*-tirosina [α -MPT], um inibidor de tirosina hidroxilase). Foi encontrada maior ocupação dos receptores D₂ por dopamina, a nível basal, tanto em esquizofrênicos de primeiro episódio (sem medicação), como nos pacientes crônicos durante um episódio de exacerbação da doença, comparado a controles saudáveis. Este estudo apresenta uma evidência direta da estimulação aumentada de D₂ por DA em esquizofrenia. Em um estudo de PET (Hirvonen et al., 2005), com gêmeos monozigóticos e dizigóticos não afetados (de pacientes com esquizofrenia), os monozigóticos não afetados apresentaram densidade de receptores D₂ aumentada em caudado, quando comparado aos dizigóticos não afetados e também aos controles saudáveis. Inclusive, foi encontrada uma associação nos monozigóticos não afetados com uma baixa performance nos testes cognitivos envolvidos com as vias córtico-estriatais, indicando maior vulnerabilidade para esquizofrenia.

A hipótese de desequilíbrio DA, no que diz respeito à hiperatividade DA subcortical, tem recebido um grande suporte de estudos de neuroimagem por PET e SPET. Os estudos de PET têm mostrado consistentemente que a esquizofrenia está associada a um aumento na projeção DA pré-sináptica para o estriado, aumentando a

atividade DA nessa região. Além disso, este aumento na atividade é mais proeminente durante episódios de exacerbação da doença, apresentando uma rápida melhora na resposta aos antipsicóticos (Abi-Dargham e Moore, 2003). Outros estudos de PET, e também de SPET, mostram que pacientes esquizofrênicos, quando psicóticos, apresentam liberação elevada de dopamina (Dao-Castellana et al., 1997; Lindstrom et al., 1999), e nível aumentado de dopamina sináptica (Breier et al., 1997; Abi-Dagham et al., 2000). Por outro lado, a hipoatividade DA cortical ainda permanece grandemente embasada em estudos de modelos pré-clínicos ou em evidências clínicas indiretas. Estudos clínicos têm sugerido uma relação entre o baixo fluxo de ácido homovanílico cerebroespinal, uma medida que reflete baixa atividade DA no CPF, e a fraca performance de tarefas envolvendo memória de trabalho (Weinberger et al., 1988; Kahn et al., 1994). Administração de agonistas DAs tem efeitos benéficos sobre a ativação pré-frontal medida com PET durante estas tarefas (Daniel et al., 1991; Dolan et al., 1995). Embora tais observações sejam consistentes com a hipótese da hipoatividade DA no CPF, não constituem evidência direta (Abi-Dargham e Moore, 2003).

Uma evidência mais direta para o déficit DA pré-frontal, foi mostrada em um estudo *post mortem*, que sugeriu uma diminuição na inervação DA no córtex pré-frontal dorso lateral (CPF_{DL}) (Akil et al., 1999). No entanto, outros estudos *post mortem* não apresentaram diferenças na densidade dos receptores D₁ em CPF_{DL} (Knable et al., 1996), ou na expressão do gene desses receptores (Meador-Woodruff et al., 1997) em esquizofrênicos. Contudo, estes estudos foram feitos em indivíduos medicados e de idade avançada, o que pode ter interferido nos resultados. O único fator de transmissão DA pré-frontal que pode ser quantificável com técnica *in vivo* não invasiva, é o receptor

D₁. Há estudos de PET que sugerem uma redução (Okubo et al., 1997; Friedman et al., 1999) na densidade dos receptores D₁ em pacientes esquizofrênicos, independentemente do tratamento medicamentoso. Todavia, a diminuição nos receptores D₁ no CPF tem sido relacionada com a severidade dos sintomas negativos e com o prejuízo cognitivo (Okubo et al., 1997; Friedman et al., 1999), sugerindo que agonistas de D₁ podem ter um papel no tratamento desses sintomas. Outros já sugerem o oposto, que o antagonista de D₁, a clozapina, em baixas doses, aumenta preferencialmente a concentração extracelular de dopamina no CPF (Brunello et al., 1995), e que isto seria o fator responsável pelos efeitos benéficos sobre os sintomas negativos e sobre a cognição.

Recentemente, foi realizado um estudo *in vivo* (PET) em roedores (Guo et al., 2003), para investigar o impacto da queda crônica de dopamina no CPF. Com a queda de dopamina, houve aumento na ligação do rádio-traçador ¹¹C-NNC 112, indicando uma super regulação dos receptores D₁, o que pode ser entendido como um efeito compensatório na falta de dopamina.

Os estudos de neuroimagem (PET e SPET) também têm investigado níveis de ocupação estriatal de receptores D₂, para antipsicóticos, tanto típicos como atípicos. De forma geral, sugerem uma janela terapêutica entre 50 % e 80 % de ocupação dos receptores D₂. Nessa janela, a relação entre ocupação e resposta terapêutica ainda não é clara (Abi-Dargham e Laruelle, 2005).

Achados recentes sugerem que a ocupação de D₂ por clozapina e quetiapina apresentam picos logo após a administração (80 e 59 %, respectivamente) e então cai rapidamente (Jones et al., 2000; Kapur et al., 2000). Sugere-se, portanto, que uma rápida dissociação do receptor D₂ deve ser suficiente para mediar a ação antipsicótica com

efeitos colaterais reduzidos e que este deve ser o fator principal de seu potencial clínico (Kapur e Seeman, 2001). Uma outra hipótese para a ação da clozapina é que esta exibe uma ocupação seletiva aos receptores D₂ corticais em relação aos estriatais, principalmente córtex temporal, incluindo amígdala e hipocampo, em doses clinicamente usuais *in vivo* (Pilowsky et al., 1997). Este efeito não é visto para doses padrão de drogas típicas (Bigliani et al., 1999). Também foi encontrada seletividade na ocupação dos receptores D₂ em regiões extra-estriatais em relação ao estriado, com o uso de outros antipsicóticos atípicos, como olanzapina e sertindol (Bigliani et al., 2000), quetiapina (Stephenson et al., 2000), amisulpirida (Xiberas et al., 2001) e risperidona (Bressan et al., 2003).

Um outro antipsicótico atípico, recentemente aprovado para o tratamento da esquizofrenia, o aripiprazol, também se apresentou eficaz na melhora dos sintomas positivos e negativos, sendo bem tolerado em adultos e, praticamente, não apresentou SEP (Davies et al., 2004). Contudo, diferentemente dos outros antipsicóticos, o aripiprazol é um agonista parcial de D₂, e sua ocupação a esses receptores é quase completa (> 90 %) (Yokoi et al., 2002). Assim, há um outro mecanismo para a ação antipsicótica, em que um agonista parcial, ao mesmo tempo em que bloqueia boa parte dos receptores D₂, também causa um efeito agonista em pequena parte destes. Esse fato seria suficiente para garantir a ação antipsicótica e, inclusive, evitar SEP (Reynolds, 2004).

3.3 Metabolismo de fosfolípides em esquizofrenia

Além de mudanças nos receptores DAs em esquizofrenia, é de extrema importância considerar que atividade aumentada da PLA₂ tem sido descrita no cérebro de esquizofrênicos (Ross et al., 1999), sugerindo distúrbios do metabolismo de fosfolípides da membrana celular, e também em regiões periféricas, como soro, plasma e plaquetas (Gattaz et al., 1987, 1990 e 1995b; Lasch et al., 2003; Smesny et al., 2005), destes pacientes. Contudo, o mecanismo de estimulação da PLA₂ na esquizofrenia ainda permanece desconhecido.

3.3.1 Funções dos fosfolípides de membrana e da fosfolipase A₂

A bicamada de fosfolípides (também chamados de glicerofosfolípides) que compõem a membrana neuronal determina suas propriedades físico-químicas (como fluidez), influencia o número e a afinidade de receptores nela ligados, e modula os processos de transdução de sinal. Os glicerofosfolípides (fosfatidiletanolamina - PE, fosfatidilcolina - PC e fosfatidilserina - PS, entre outros), juntamente com o colesterol, são os principais componentes da bicamada da membrana neuronal e formam a matriz na qual receptores, canais iônicos e outras proteínas envolvidas em transdução de sinais estão alojados (Agranoff et al., 1999). Esses compostos contêm uma molécula de glicerol como componente básico, ao qual um grupo fosfato (PO₄) é esterificado no carbono α (*sn*-3) e dois ácidos graxos são esterificados nos dois átomos de carbono remanescentes (posições *sn*-1 e *sn*-2). O glicerol e o PO₄, que é ligado a uma base (etanolamina, colina, serina, inositol) ou a um átomo de hidrogênio (ácido fosfatídico),

formam a cabeça polar (hidrofílica), e os ácidos graxos esterificados formam a cauda apolar (hidrofóbica) dos glicerofosfolípidos. Os ácidos graxos podem ter de 16 a 24 átomos de carbono e, normalmente, a primeira cadeia é saturada (*sn-1*) e a segunda insaturada (*sn-2*) com uma ou mais duplas ligações (Figura 3), sendo que o grau de insaturação dessas moléculas determina o arranjo espacial bem como a fluidez da membrana. Os ácidos graxos insaturados são distribuídos em duas séries: ômega-3 (n-3) e ômega-6 (n-6). O ácido araquidônico (AA; 20:4n-6) (número de carbono, número de insaturações e série) e o ácido docosahexaenóico (DHA; 22:6n-3), por exemplo, estão concentrados na substância cinzenta, e juntos respondem por aproximadamente 20 % dos ácidos graxos da membrana sinaptossomal (Fenton et al., 2000).

O conteúdo específico dos ácidos graxos essenciais na membrana pode modificar o funcionamento neuronal e produzir efeitos clínicos através de dois mecanismos: (1) mudanças no conteúdo desses ácidos graxos alteram o micro-ambiente e, conseqüentemente, a estrutura e função de receptores, canais iônicos e enzimas; (2) os ácidos graxos essenciais contribuem para a regulação celular por atuar como uma fonte de precursores para segundos mensageiros na transdução de sinal intra- e inter celulares, o que aumenta sua relevância para a neurotransmissão (Agranoff et al., 1999; Fenton et al., 2000).

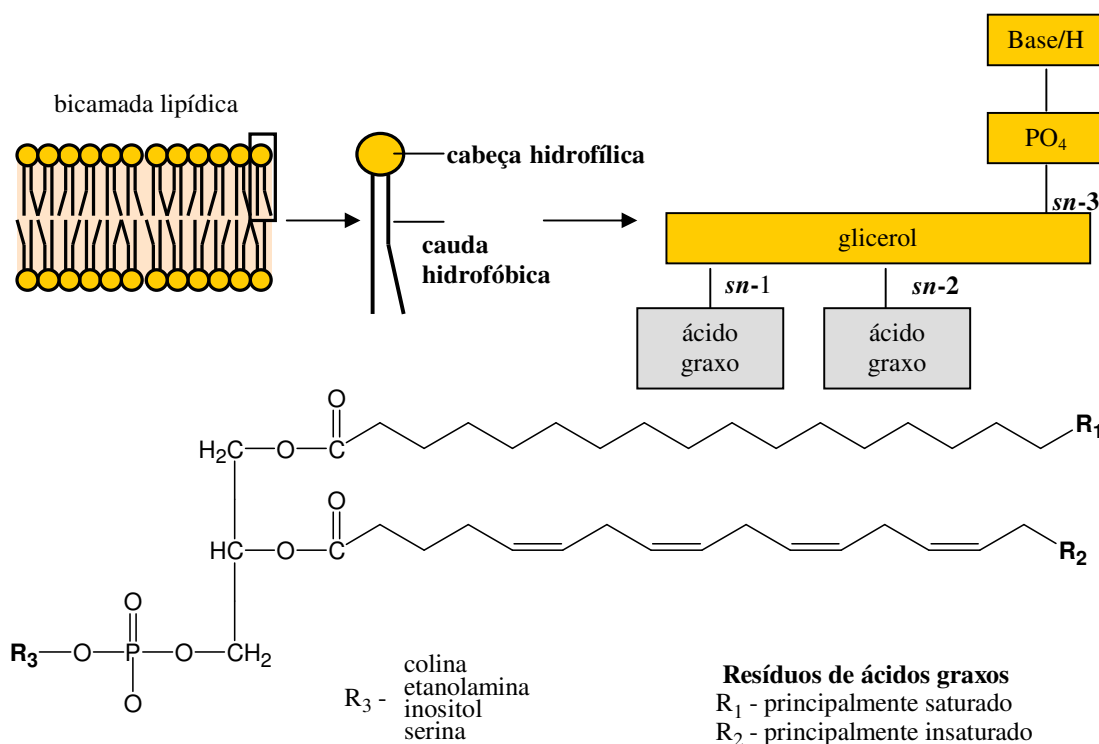


Figura 3: Estrutura química dos glicerofosfolípides de membranas celulares. Na posição *sn-1* é geralmente encontrado um resíduo de ácido graxo saturado, como ácido palmítico ou esteárico, e na posição *sn-2* um resíduo de ácido graxo insaturado, como ácido oléico, linoléico ou araquidônico. O grupo fosfato é ligado a um átomo de hidrogênio - H (ácido fosfatídico) ou a uma base, como colina ou etanolamina.

O metabolismo dos fosfolípides é controlado por enzimas ligadas à membrana, sendo a PLA₂ a mais relevante. A PLA₂ (Figura 4) catalisa a clivagem da ligação éster da posição *sn-2* dos fosfolípides (principalmente PC), liberando ácidos graxos essenciais (AGE), como o AA. Por sua vez, o AA pode atuar como um segundo mensageiro, sendo também um precursor, através da ação de lipooxigenases e ciclooxigenases, de eicosanóides (importantes na estimulação de processos inflamatórios, que vão desde asma até artrite; e nas transduções de sinal, como regulação do fluxo sanguíneo), além de ativar a proteína cinase C (PKC), estimular a liberação de Ca²⁺, modular a atividade de várias enzimas importantes, e regular a

transcrição gênica. Outros produtos da clivagem dos fosfolípidos pela PLA₂ são os lisofosfolípidos, importantes na sinalização celular, remodelamento de fosfolípidos e propriedades de fluidez e permeabilidade da membrana (Dennis, 1994; Six e Dennis, 2000; Farooqui e Horrocks, 2004). Os lisofosfolípidos sofrem a ação subsequente da fosfolipase A₁ (PLA₁) para liberar o ácido graxo da posição *sn*-1. O outro produto da ação da PLA₁ consiste em fosfodiésteres (PDE), que por sua vez são clivados pelas fosfodiesterases, produzindo fosfomonoésteres (PME), que são usados na síntese de novos fosfolípidos de membrana.

A estimulação da PLA₂ interfere na atividade neuronal por vários mecanismos: (1) resulta na perda de fosfolípidos essenciais, com acúmulo de ácidos graxos livres e lisofosfolípidos que devem ter um efeito semelhante aos detergentes sobre as membranas neuronais; (2) ácidos graxos livres podem prejudicar a fosforilação oxidativa, resultando em uma disfunção mitocondrial, onde, por exemplo o AA produz inchaço mitocondrial e induz a mudanças na permeabilidade da membrana por regular canais iônicos; (3) o acúmulo de ácidos graxos livres pode acionar uma cascata de AA descontrolada, que pode levar a prejuízos neuronais, além de prejudicar também proteínas de membrana e o DNA; (4) aumento descontrolado no influxo de Ca²⁺ através de um aumento na degradação de fosfolípidos pode levar a um aumento na permeabilidade de membrana e na estimulação de enzimas associadas com lipólise, proteólise e desagregação de microtúbulos com ruptura do citoesqueleto e da estrutura da membrana (Farooqui et al., 1999).

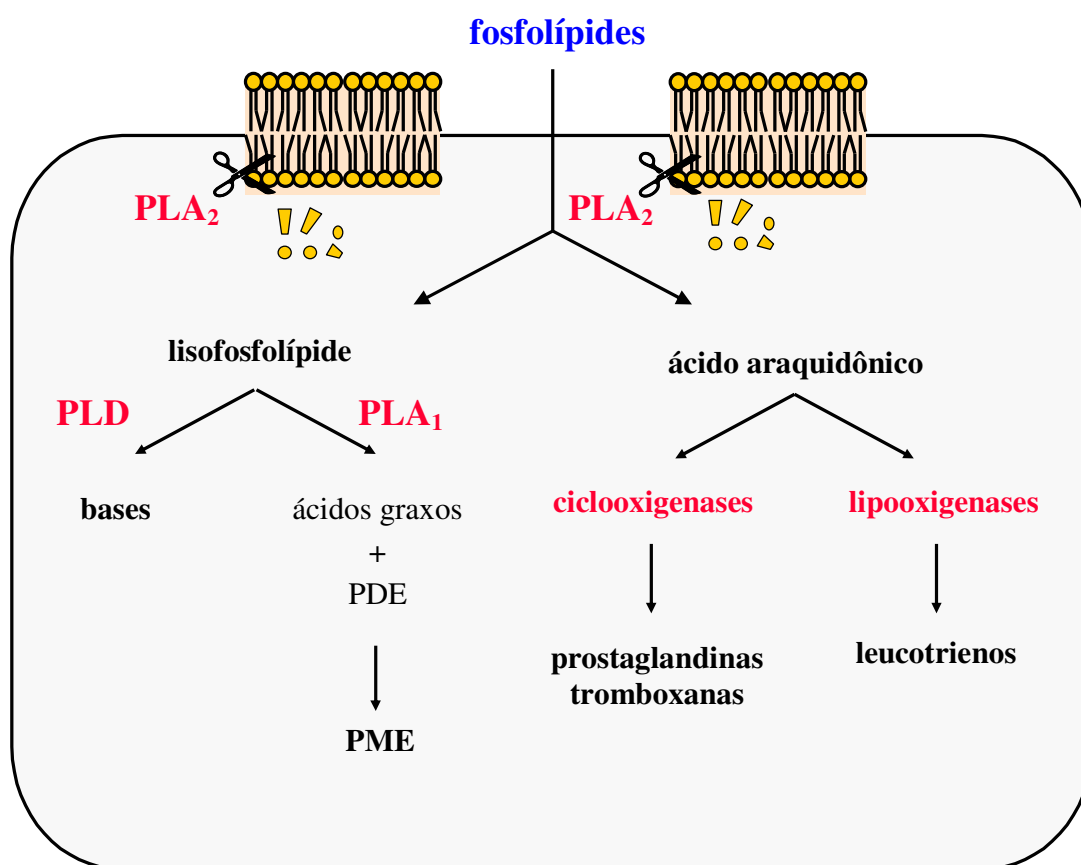


Figura 4: PLA₂ e alguns produtos de sua ação catalítica sobre os fosfolípides de membranas celulares.

3.3.2 A família de enzimas fosfolipases A₂

Até o momento foram identificadas, pelo menos, 20 enzimas com atividade de PLA₂, em mamíferos, as quais podem ser classificadas em: (a) PLA₂ extracelular ou secretada, a qual é dependente de Ca²⁺, e é subdividida em diversos grupos: PLA₂GIB, PLA₂GII (PLA₂GIIA, PLA₂GIIB, PLA₂GIIC, PLA₂GIID, PLA₂GIIE e PLA₂GIIF), PLA₂GIII, PLA₂GV, PLA₂GX, PLA₂GXII e PLA₂GXIII; (b) PLA₂ intracelular citosólica, dependente de Ca²⁺, PLA₂GIV, que é dividida em três subgrupos:

PLA₂GIVA, PLA₂GIVB e PLA₂GIVC; e PLA₂ intracelular independente de Ca²⁺, que consiste de dois grupos maiores: PLA₂GVI, subdividido em PLA₂GVIA (PLA₂GVIA-1 e PLA₂GVIA-2) e PLA₂GVIB, e PAF-acetilhidrolases (plasmáticas), subdivididas em PLA₂GVII (PLA₂GVIIA e PLA₂GVIIB) e PLA₂GVIII (PLA₂GVIII A e PLA₂GVIIB). Porém, apenas algumas PLA₂ estão presentes no cérebro humano, e são subdivididas de acordo com sua estrutura, propriedades enzimáticas, localização subcelular e função celular (Six e Dennis, 2000; Winstead et al., 2000; Kudo e Murakami, 2002; Chakraborti, 2003; Farooqui e Horrocks, 2004).

No cérebro humano foi detectado o mRNA de quatro grupos de PLA₂ secretadas, que são a PLA₂GIIE, PLA₂GV, PLA₂GX e PLA₂GXII (Chen et al., 1994; Gelb et al., 2000b; Suzuki et al., 2000). Adicionalmente, foi detectado o mRNA dos três grupos de PLA₂GIV. O mRNA da PLA₂GIVA foi encontrado no hipocampo, amígdala, substância negra, tálamo, núcleo subtalâmico e corpo caloso (Sharp e White, 1993; Pickard et al., 1999). O mRNA da PLA₂GIVB foi detectado no lobo temporal e frontal, pólo occipital, hipocampo, amígdala, núcleo caudado, putamen, substância negra, tálamo, núcleo subtalâmico, cerebelo e corpo caloso (Pickard et al., 1999; Song et al., 1999). O mRNA da PLA₂GIVC foi detectado no hipocampo, amígdala, núcleo caudado, substância negra, tálamo, núcleo subtalâmico e corpo caloso (Underwood et al., 1998; Pickard et al., 1999). Finalmente, também foi detectado o mRNA da PLA₂GVIA e PLA₂GVIB, entretanto, não há descrições especificando a região cerebral desse grupo (Larsson Forsell et al., 1999; Mancuso et al., 2000; Tanaka et al., 2000). Na Tabela 1 encontram-se algumas características de subgrupos da PLA₂GIV e PLA₂GIV.

Tabela 1*: Características da fosfolipase A₂ grupo IV e da fosfolipase A₂ grupo VI expressas em cérebro humano

Grupo	Peso molecular	Cromossomo	Expressão	Sensibilidade ao Ca²⁺	Localização celular	Especificidade ao ácido graxo na posição <i>sn</i>-2 da fosfatidilcolina
PLA₂GIVA	85 kDa (749 aminoácidos)	1q25	Hipocampo, amígdala, substância negra, tálamo, núcleo subtalâmico, corpo caloso	Dependente de Ca ²⁺ nanomolar e micromolar	Citosol	araquidônico 23 x > palmítico araquidônico 7 x > olêico araquidônico 3,5 x > linoléico
PLA₂GIVB	114 kDa (1012 aminoácidos)	15	Lobo temporal, lobo frontal, pólo occipital, hipocampo, amígdala, núcleo caudado, putamen, substância negra, tálamo, núcleo subtalâmico, cerebelo, corpo caloso	Dependente de Ca ²⁺ milimolar ?	Citosol	Libera ácido araquidônico
PLA₂GIVC	61 kDa (541 aminoácidos)	19q13.3	Hipocampo, amígdala, núcleo caudado, substância negra, tálamo, núcleo subtalâmico, corpo caloso	Independente de Ca ²⁺	Ligada a membranas	araquidônico 3,5 x > palmítico araquidônico 2,5 x > linoléico araquidônico 2 x > olêico
PLA₂GVIA-1	84-85 kDa (782 aminoácidos)	22q13.1	Cérebro	Independente de Ca ²⁺	Citosol	Libera ácido araquidônico e ácido olêico
PLA₂GVIA-2	88 kDa (806 aminoácidos)	22q13.1	Cérebro	Independente de Ca ²⁺	Ligada a membranas	Libera ácido araquidônico
PLA₂GIVB	~88 kDa (782 aminoácidos)	7q31	Cérebro	Independente de Ca ²⁺	Ligada a membranas	araquidônico 2 x > olêico araquidônico 1,5 x > linoléico

* Tabela obtida da tese de doutorado de Schaeffer, 2004.

3.3.2.1 Propriedades enzimáticas da PLA₂GIV

a) PLA₂GIVA

É a PLA₂GIV melhor caracterizada até o momento. Essa PLA₂ consiste de dois domínios funcionalmente distintos: (1) domínio de ligação a lípides de membrana dependente de Ca²⁺ no terminal amino (N-terminal), ou domínio C2 (138 aminoácidos), contendo os resíduos de ligação de Ca²⁺ e de ligação a membranas; e (2) domínio catalítico independente de Ca²⁺ no terminal carboxil (C-terminal), contendo os resíduos do sítio ativo (Nalefski et al., 1998).

A PLA₂GIVA, por estar presente no citosol, precisa de algo que lhe dê acesso aos substratos fosfolipídicos, e é devido a isso que há a necessidade de íons Ca²⁺. O aumento na concentração interna desses íons ocorre pela mobilização de Ca²⁺ armazenado internamente e/ ou pelo influxo de Ca²⁺ do espaço extracelular via canais operados por voltagem ou por receptores (Hirabayashi e Shimizu, 2000).

O domínio C2 isolado da PLA₂GIVA humana mostrou uma seletividade para a ligação a vesículas de fosfolípidos com cabeça polar com características hidrofóbicas (cabeça polar neutra), como PC e PE, em relação a vesículas de fosfolípidos com cabeça polar ácida (ou aniônica), como ácido fosfatídico, PS, fosfatidilinositol (PI) e fosfatidilglicerol (Nalefski e Falke, 1996; Nalefski et al., 1998).

A estrutura do domínio C2 da PLA₂GIVA tem sido determinada por cristalografia de raio-x e RMN, e consiste em duas folhas de quatro fitas β cada, antiparalelas. A folha 1 é composta pelas fitas β 1, β 4, β 7 e β 8, e a folha 2 pelas fitas

$\beta 2$, $\beta 3$, $\beta 5$ e $\beta 6$. As ligações das fitas $\beta 1$ - $\beta 2$, $\beta 3$ - $\beta 4$ e $\beta 5$ - $\beta 6$ revelaram três dobras distintas em um final do domínio, chamadas regiões de ligação de Ca^{2+} (“ Ca^{2+} - binding regions”; CBRs): CBR1, CBR2 e CBR3, respectivamente (Nalefski e Falke, 1996; Rizo e Südhof, 1998; Hirabayashi et al., 2004) (Figura 5a). Os CBRs estão envolvidos na ligação de Ca^{2+} através de uma constelação de resíduos ácidos (D = Asp ou aspartato) e básicos (N = Asn ou asparagina), os quais circundam dois sítios de ligação de Ca^{2+} adjacentes, CAI e CAII, onde se ligam dois íons Ca^{2+} (Figura 5b; CAI = I e CAII = II) (Perisic et al., 1998; Dessen et al., 1999). Tanto CBR1 quanto CBR3 tem um grupo proeminente de resíduos hidrofóbicos (F = Phe ou fenilalanina; M = Met ou metionina; L = Leu ou leucina; Y = Tyr ou tirosina; V = Val ou valina) (Figura 5c), os quais, junto com uma tira adjacente de resíduos básicos na fita $\beta 3$ (R = Arg ou arginina; K = Lys ou lisina), parecem constituir o sítio de ligação a membranas (Perisic et al., 1998).

Um estudo de espectroscopia por RMN tridimensional do domínio C2 isolado da PLA_2GIVA mostrou que as dobras da ligação de Ca^{2+} contendo resíduos hidrofóbicos (CBR1 e CBR3) sofrem mudanças conformacionais através de interação com micelas de PC (Xu et al., 1998). Além disso, foi encontrado que tanto a PLA_2GIVA completa, quanto seu domínio C2 isolado, foi capaz de penetrar em membranas de uma maneira dependente de Ca^{2+} (Davletov et al., 1998; Lichtenbergova et al., 1998). Essa penetração é essencial para a ligação hidrofóbica exercer sua atividade catalítica interfacial, ou seja, sobre substratos na interface membrana-água (Gelb et al., 2000a). Portanto, além de desempenharem um papel no deslocamento da PLA_2GIVA do citosol

para a superfície das membranas, íons Ca^{2+} são importantes para a penetração da PLA_2GIVA em membranas e para sua ligação hidrofóbica interfacial e, conseqüentemente, para sua atividade catalítica interfacial.

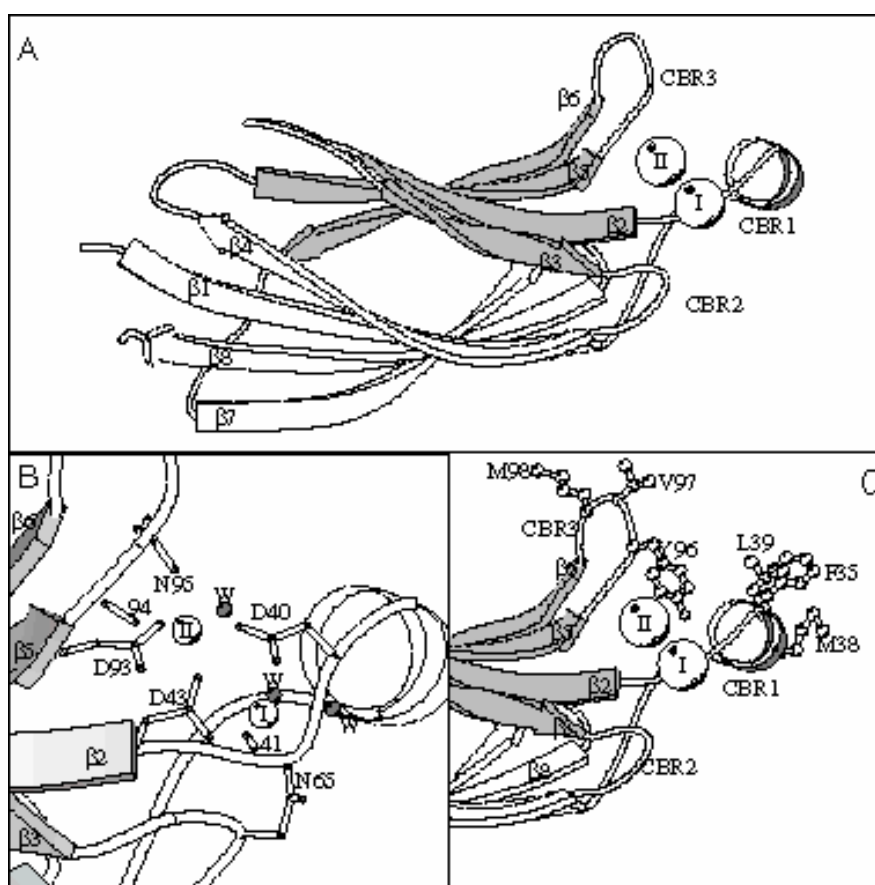


Figura 5*: Representação esquemática do domínio C2 da PLA_2GIVA humana. (a) Duas folhas de quatro fitas β cada, cujas ligações formam três dobras chamadas de regiões de ligação de Ca^{2+} (CBRs). (b) As CBRs contêm vários resíduos ácidos (D = Asp ou aspartato) e básicos (N = Asn ou asparagina) envolvidos na ligação de Ca^{2+} pela coordenação de dois sítios de ligação de Ca^{2+} adjacentes (I e II). (c) CBR1 e CBR3 contêm um número proeminente de resíduos hidrofóbicos (F = Phe ou fenilalanina; M = Met ou metionina; L = Leu ou leucina; Y = Tyr ou tirosina; V = Val ou valina) envolvidos na ligação a membranas.

*Fonte da Figura: <http://www.mrc-lmb.cam.ac.uk/rlw/text/cpla2/fig1legend.html>

Sob o aspecto mecanístico, o sítio ativo da PLA₂GIVA contém o resíduo Ser (serina) 228, que é essencial para a atividade catalítica dessa enzima. A catálise da PLA₂GIVA procede então, com o emprego de um díade formado por Ser 228 e Asp 549, com o Asp 549 atuando como uma base geral, ativando diretamente a Ser 228. Após um aumento no Ca²⁺ intracelular e translocação subsequente da PLA₂GIVA para a membrana, uma molécula individual de substrato pode ligar-se ao sítio ativo de tal forma que sua ligação éster em *sn*-2 fique bem próxima ao resíduo Ser 228. O grupo fosfato da cabeça fosfolipídica é estabilizado pelo “guanidinium” do resíduo Arg 200 (sugerindo ser por isso que está distantemente posicionado da Ser 228). Realizada a formação do complexo enzima-substrato, a Ser 228 ataca o éster da posição *sn*-2 e abstrai um próton (H⁺), após ser ativada pelo Asp 549. Um orifício oxianion estabilizado pelos grupos amida dos resíduos Gly 197 e Gly 198 polariza o éster em *sn*-2 e estabiliza o estado de transição (ET) do intermediário tetraédrico formado. A Ser 228 transfere um H⁺ para uma molécula de lisofosfolípide, causando a decomposição do intermediário tetraédrico, levando a uma molécula acil-serina. A hidrólise desse intermediário pela água, ocorre então, por um mecanismo análogo. A PLA₂GIVA deverá dissociar-se da interface da bicamada ou ligar-se a um outro substrato fosfolipídico, repetindo o ciclo (Figura 6) (Clark et al., 1995; Dessen, 2000; Balsinde et al., 2002; Hirabayashi et al., 2004).

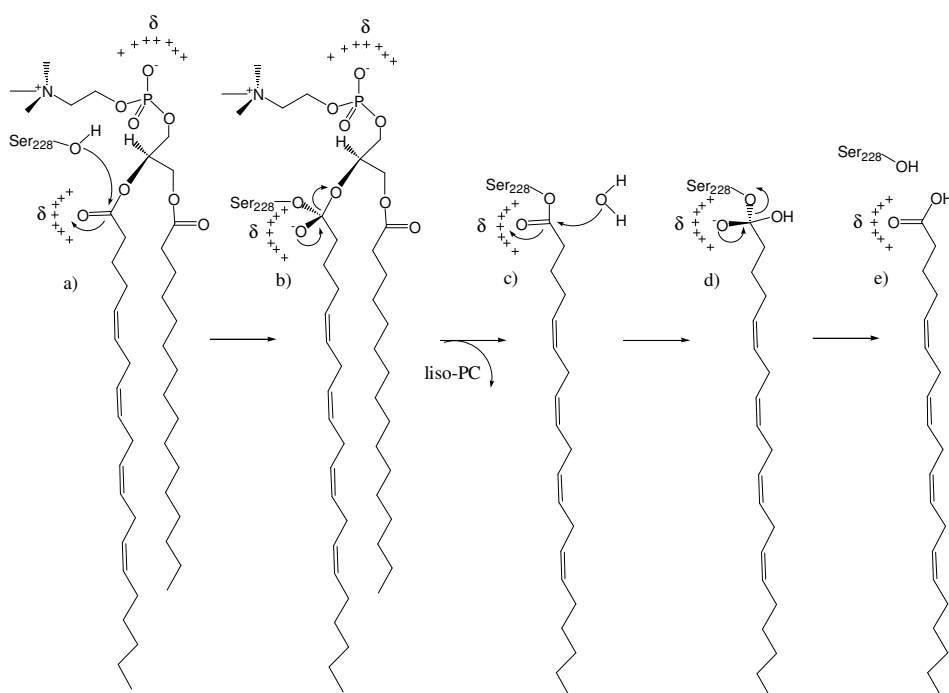


Figura 6*: Modelo proposto para o mecanismo catalítico da PLA₂GIVA. (a) Com o aumento no Ca²⁺ intracelular, a PLA₂GIVA associa-se aos fosfolípidos de membrana através de seu domínio C2. Uma molécula de fosfolípido então se liga ao sítio ativo da enzima, através de um ataque nucleofílico da Ser 228 em *sn*-2 para formar a acil-enzima via (b) um intermediário tetraédrico estabilizado pelo oxianion, que polariza o éster na posição *sn*-2. (c) e (d) A acil-enzima é então hidrolizada por uma molécula de H₂O para liberar, por fim, (e) o AA livre. A PLA₂GIVA deve assim, dissociar-se da interface de membrana ou ligar-se a uma outra molécula de substrato fosfolipídico, para então repetir o ciclo catalítico.

* Adaptada de Clark et al., 1995

b) PLA₂GIVB

Essa PLA₂ também está localizada no citosol, porém, na presença de íons Ca²⁺ desloca-se para as membranas. A liberação de AA do substrato PC¹⁴C pela PLA₂GIVB foi estritamente dependente de Ca²⁺, uma vez que não foi detectada atividade da enzima na presença do quelante de Ca²⁺, etileno glicol-bis-(b-amino-etil éter) (EGTA) (Song et al., 1999). Adicionalmente, foi observada uma diminuição da atividade dessa PLA₂ de 5-10 vezes na presença de outro quelante de Ca²⁺, tetra acetato de etilenodiamina (EDTA), em relação à atividade observada na presença de Ca²⁺ 1,0 mM (Pickard et al.,

1999). Segundo os autores, não foi possível determinar a concentração mínima de Ca^{2+} requerida para a atividade da PLA_2GIVB devido a impurezas nos lisados de células. Tomados em conjunto, os achados descritos sugerem que a PLA_2GIVB pode responder a agonistas que mobilizam Ca^{2+} de maneira similar à PLA_2GIVA . A sensibilidade da PLA_2GIVB ao Ca^{2+} é provavelmente devida a uma região na sua seqüência de aminoácidos que possui uma semelhança ao domínio C2 da PLA_2GIVA (Song et al., 1999).

c) PLA_2GIVC

A PLA_2GIVC não contém o domínio C2 (Underwood et al., 1998; Pickard et al., 1999), o qual é importante para a ligação dependente de Ca^{2+} da PLA_2GIVA a membranas (Nalefski et al., 1994), indicando que a ativação da PLA_2GIVC é regulada por um mecanismo diferente daquele da PLA_2GIVA , bem como da PLA_2GIVB . A investigação da presença da PLA_2GIVC humana no sobrenadante ou no “pellet” de membranas de células de ovário de hamster chinês (CHO) ou de células de insetos Sf9 super expressando a enzima encontrou que a PLA_2GIVC localiza-se na fração de membranas (Underwood et al., 1998; Stewart et al., 2002). A determinação do requerimento de Ca^{2+} para a atividade da PLA_2GIVC em lisados de células COS super expressando a enzima, incubados com o substrato PC^{14}C , na ausência de Ca^{2+} ou na presença de Ca^{2+} 10 μM ou 10 mM , mostrou que a atividade da enzima não é afetada por Ca^{2+} (Underwood et al., 1998). Além disso, a atividade da PLA_2GIVC não foi afetada ao quelar o Ca^{2+} por EDTA (Pickard et al., 1999). Esses achados indicam que a

PLA₂GIVC é uma enzima independente de Ca²⁺ e é fortemente ligada a membranas. Porém, pertence ao grupo de enzimas dependentes de Ca²⁺ devido a sua grande semelhança estrutural com as PLA₂ desse grupo, principalmente seu domínio catalítico, que é bem semelhante ao da PLA₂GIVA (Underwood et al., 1998).

3.3.2.2 Propriedades enzimáticas da PLA₂GVI

Embora a PLA₂GVI não tenha muita preferência em clivar fosfolípidos com AA, e como está diretamente envolvida na regulação das reações de remodelamento de ácidos graxos nos fosfolípidos de membranas celulares, então deve influenciar a distribuição subcelular de AA entre os diferentes compartimentos, bem como a quantidade relativa de ácido graxo presente em cada compartimento celular (Balsinde et al., 1999).

a) PLA₂GVIA

A determinação da atividade dessa PLA₂ no sobrenadante ou no “pellet” de membranas de células COS super expressando a enzima, incubados com ambos os substratos PC¹⁴C e PE¹⁴C, mostrou níveis de atividade similares na fração citosólica de células controles e de células super expressando a PLA₂GVIA, enquanto que sua atividade na fração de membranas de células super expressando a enzima foi 5,5 vezes maior do que aquela em células controles. Foi observada uma correlação entre a atividade aumentada da PLA₂GVIA e a presença maior da enzima na fração de membranas, indicando que a PLA₂GVIA é uma proteína ligada a membranas (Larsson Forsell et al., 1999). A determinação do requerimento de Ca²⁺ para a atividade da

PLA₂GVIA humana em lisados de células COS que super expressam a enzima, incubados com ambos os substratos PC¹⁴C e PE¹⁴C, na ausência de Ca²⁺ ou na presença de Ca²⁺ 5,0 mM, mostrou que a atividade da enzima foi significativamente maior na ausência de Ca²⁺ (Larsson et al., 1998).

Sob o ponto de vista mecanístico, a PLA₂GVI, assim como a PLA₂GIV, parece atuar como uma serina-hidrolase, com um resíduo Ser ativo (Ser 519) localizado no meio da seqüência GX SXG, comum a muitas outras lipases (Balsinde et al., 1999). Evidências sugerem que a PLA₂GVI também opera via um intermediário acil-enzima, onde a enzima ataca, primeiramente, a cadeia acil de um fosfolípide, em *sn*-2, para formar um intermediário acil-enzima. Subseqüentemente, a competição entre uma molécula de água ou de um lisofosfolípide como nucleófilos no ataque sobre o intermediário acil-enzima resulta na hidrólise para o ácido graxo livre, ou na transacilação para formar fosfolípidos, respectivamente (Lio e Dennis, 1998).

b) PLA₂GVIB

A determinação da atividade da PLA₂GVIB no sobrenadante ou no “pellet” de membranas de células Sf9 ou de células COS super expressando a enzima mostrou níveis similares tanto na fração citosólica de células controles quanto na de células que super expressam a PLA₂GVIB. A atividade dessa enzima foi detectada predominantemente na fração de membranas. A determinação do requerimento de Ca²⁺ para a atividade da PLA₂GVIB humana no “pellet” de membranas de células Sf9 super expressando a enzima, incubado com PC sintética como substrato, na ausência ou na

presença de Ca^{2+} (variando de 0-10 mM), mostrou que a atividade da PLA_2GVIB foi independente de Ca^{2+} (Mancuso et al., 2000; Tanaka et al., 2000).

Por haver diferentes grupos e subgrupos de PLA_2 , torna-se necessário identificar qual ou quais deles predominam nas diferentes regiões cerebrais. Este aspecto foi levado em consideração durante a execução deste trabalho. Porém, com a técnica aqui utilizada, foi possível determinar apenas o grupo de PLA_2 predominante, sem poder afirmar quais subgrupos estão presentes.

3.3.3 Evidências de alterações no metabolismo dos fosfolípides de membrana em esquizofrenia

A atividade da PLA_2 em soro (Gattaz et al., 1990; Nojonen et al., 1993; Lash et al., 2003; Tavares et al., 2003), plasma (Gattaz et al., 1987) e plaquetas (Gattaz et al., 1995b) tem se mostrado anormalmente alta em pacientes esquizofrênicos sem medicação, sendo encontrada também aumentada no córtex temporal desses pacientes (Ross et al., 1999). Foi encontrada, inclusive, quantidade aumentada de PLA_2 em células vermelhas do sangue (MacDonald et al., 2004). Recentemente, foi feito outro estudo em soro de esquizofrênicos, desta vez comparando pacientes de primeiro episódio com pacientes crônicos (multi-episódicos) e controles. Foi confirmado um aumento na atividade da PLA_2 , sendo significativo apenas em pacientes de primeiro episódio, tanto em relação a controles como aos pacientes crônicos (Smesny et al., 2005). Ainda em soro de pacientes esquizofrênicos, o uso de antipsicóticos (haloperidol, olanzapina, amisulpirida e risperidona) fez com que a atividade da PLA_2 diminuísse

significativamente (Gattaz et al., 1987; Tavares et al., 2003). Todavia, essa inibição da PLA₂ pelos antipsicóticos desapareceu após continuação do tratamento por seis meses ou mais (Schmitt et al., 2001). Além das evidências diretas de alteração na atividade da PLA₂, em plaquetas de esquizofrênicos, foram encontrados diminuição na concentração de PC (substrato da PLA₂) e aumento na concentração de lisoPC (produto da ação catalítica da PLA₂) (Pangerl et al., 1991). Para averiguar se as alterações nas membranas observadas em tecidos periféricos também ocorrem em tecido cerebral, foi realizado um estudo em caudado *post mortem* de sujeitos esquizofrênicos, onde foram encontradas quantidades significativamente menores de PC e PE quando comparado a controles saudáveis ou a outras desordens mentais (não houve diferença significativa entre os grupos controles) (Yao et al., 2000). Todos esses achados estão de acordo com a hipótese de uma quebra acelerada de fosfolípides na esquizofrenia.

Há também trabalhos que encontraram alterações na atividade da PLA₂ em transtornos de humor (aumento) (Chang e Jones, 1998; Chang et al., 1999) e na doença de Alzheimer (diminuição) (Gattaz et al., 1995a e 1996; Ross et al., 1998b). Entretanto, além do aumento na atividade da PLA₂ em transtornos de humor ser menor do que na esquizofrenia, tal aumento pode ter sido decorrente do uso de estabilizadores de humor ou de antidepressivos, já que os indivíduos que participaram do estudo estavam medicados em sua maioria. Uma outra explicação seria que o aumento da perda de ácidos graxos polinsaturados dos fosfolípides de membrana, por excesso de atividade da PLA₂ estaria relacionado ao aparecimento de um transtorno de humor, enquanto na esquizofrenia haveria também uma diminuição da incorporação de ácidos graxos essenciais (Horrobin e Bennet, 1999a e b). Já em um estudo *post mortem* (Ross et al.,

1999), não foi encontrada alteração na atividade da PLA₂ em sujeitos com transtorno bipolar, e foi encontrado aumento em pacientes com esquizofrenia. Em plaquetas (Gattaz et al., 1995a), também não foi encontrada alteração na atividade da PLA₂ entre controles normais e psiquiátricos (depressão, transtorno bipolar e de personalidade).

Estudos de espectroscopia por RMN³¹P, também têm fornecido evidências de que o metabolismo de fosfolípides está acelerado no cérebro de esquizofrênicos. Pacientes sem medicação neuroléptica têm apresentado níveis de PME e de ortofosfato inorgânico significativamente reduzidos, e níveis elevados de PDE e de adenosina trifosfato (ATP) no córtex pré-frontal dorsal (hipofrontalidade) comparado a controles saudáveis. Os resultados encontrados com ATP e ortofosfato inorgânico sugerem uma hipoatividade funcional do córtex pré-frontal dorsal, pois indica um prejuízo da conversão de substratos energéticos em atividade neuronal, o que pode ser averiguado por testes neuropsicológicos. Já os resultados com PME e PDE devem ser devidos a um aumento no metabolismo de fosfolípides nesta região cerebral (Pettegrew et al., 1991; Stanley et al., 1995). Resultados similares foram encontrados nos lobos temporais de esquizofrênicos, apresentando níveis elevados de PDE e reduzidos de PME, juntamente com um aumento nos níveis de fosfocreatina no lobo temporal esquerdo (Fukuzako et al., 1999a). Todavia, o uso de haloperidol diminuiu significativamente os níveis de PDE (Fukuzako et al., 1999b). Por outro lado, Yacubian e colaboradores (2002) encontraram nível reduzido de PDE no lobo frontal de esquizofrênicos.

Como tentativa de explicar as alterações na atividade da PLA₂ em esquizofrenia, também têm sido realizados uma série de estudos para investigar diferentes polimorfismos do gene da PLA₂ (Hudson et al., 1996; Peet et al., 1998; Frieboes et al.,

2001). No estudo descrito por Hudson e colaboradores, foi encontrada uma variação genética (repetições poli-As) próxima à região promotora do gene da PLA₂GIV no cromossomo 1. Entretanto, outros autores não encontraram associações entre o gene da PLA₂ e esquizofrenia (Peet et al., 1998; Frieboes et al., 2001). Talvez as diferenças entre os estudos possam ser explicadas por tratarem-se de grupos populacionais diferentes (Frieboes et al., 2001). Recentemente (Rybakowski et al., 2003), foi mostrada uma associação entre um dos polimorfismos da PLA₂GIV (polimorfismo em único nucleotídeo no primeiro íntron do cromossomo 1q25, sítio polimórfico BanI) e os distúrbios de movimento dos olhos, um marcador endofenótipo para a esquizofrenia. Pae e colaboradores (2004) também encontraram diferenças significativas nas distribuições genótípicas e alélicas no gene da PLA₂GIV (BanI), entre esquizofrênicos e controles. Em particular, o alelo A₂ foi associado a um risco aumentado de esquizofrenia. Em outro estudo (Junqueira et al., 2004), no qual foram investigados polimorfismos nos genes de diferentes grupos de PLA₂, não foram observadas diferenças na distribuição alélica e genotípica de polimorfismos de PLA₂GIV e de PLA₂ secretadas. Contudo, foi encontrada uma associação alélica e genotípica com o polimorfismo no gene da PLA₂GVI, sugerindo que possa ser um gene que leva a uma susceptibilidade à esquizofrenia.

A esquizofrenia também tem sido discutida por diversos autores como uma doença do neurodesenvolvimento (Pilowsky et al., 1993; Lieberman, 1999; Rapoport et al., 2005). Em linha com este conceito de neurodesenvolvimento, tem sido investigado se déficits nutricionais durante a gravidez e a infância podem contribuir para um risco aumentado de esquizofrenia, já que os AGE apresentam um importante papel no

desenvolvimento e funcionamento cerebral (Berger et al., 2002; Haag et al., 2003). Forlenza e colaboradores (2002) estudaram a atividade da PLA₂ em cérebros de ratos e em culturas primárias de neurônios corticais. Observaram uma queda gradual da atividade da enzima durante o desenvolvimento embrionário e com a maturação das células da cultura. Esse dado reforça a importância da PLA₂ no neurodesenvolvimento. Mudanças na maturação de cérebros normais ocorridas no final da infância e no início da adolescência resultam em diminuição (30 - 40 %) da densidade sináptica (Huttenlocher, 1979). Em esquizofrenia, pode estar havendo um prejuízo no processo de poda sináptica, ou seja, uma eliminação das conexões sinápticas acima do normal (Feinberg, 1982/83; Hoffman e Dobscha, 1989). A atividade da PLA₂ mantida elevada durante o crescimento neurítico poderia ser um dos fatores responsáveis por esse prejuízo na poda sináptica e, assim, predispor ao aparecimento da esquizofrenia posteriormente (Tavares, 2002).

Em uma revisão sobre AGE (Fenton et al., 2000), foi descrita uma queda em alguns desses AGE, AA, ácido linolêico (AL) e ácido docosahexaenóico (DHA), em membranas de células vermelhas, trombócitos e fibroblastos de esquizofrênicos. Reduções em AGE também foram encontradas em tecido cerebral *post mortem* desses pacientes em relação a controles saudáveis (Yao et al., 2000). Essa diminuição dos AGE reforçam a hipótese de um metabolismo acelerado de fosfolípidos de membrana em esquizofrenia. Com esses dados, é possível supor uma aplicabilidade dos fosfolípidos e de substâncias relacionadas ao metabolismo fosfolipídico no tratamento da esquizofrenia, como tem sido proposto por alguns autores (Mellor et al., 1996; Peet e Mellor, 1998; Shah et al., 1998). Mellor e colaboradores (1996) forneceram 10 g de óleo

de peixe concentrado para pacientes com esquizofrenia por algumas semanas. Observaram melhora de sintomas positivos e negativos. Tal melhora, significativa apenas para os sintomas negativos, estava associada a um aumento dos níveis de AGE da série n-3. Shah e colaboradores (1998) utilizaram ácido eicosapentaenóico (EPA) como tratamento adjuvante de esquizofrênicos que se mantinham altamente sintomáticos apesar do uso de neurolépticos. Obtiveram uma queda da média na pontuação da “Positive And Negative Symptoms Scale” (PANSS) de 75,3 para 45,5.

Contudo, pensar nas alterações dietéticas como causa da esquizofrenia realmente seria ingenuidade, entretanto, é plausível considerar a dieta como mais um fator contribuinte para a eclosão de crises e para auxiliar na gravidade da doença.

3.4 Fosfolipase A₂, fosfolípides de membrana e receptores dopaminérgicos

Vêm sendo realizados estudos que apresentam relações entre o sistema DA, atividade da PLA₂ e fosfolípides de membrana.

A PLA₂ influencia as propriedades físico-químicas de membranas sinápticas (Farooqui et al., 1992), e provoca um aumento na liberação de dopamina (Bradford et al., 1983; Ohmichi et al., 1989). Estudos com dois modelos animais de comportamento (modelo rotacional e de alterações comportamentais) mediado por dopamina mostraram que a atividade DA foi inibida com a aplicação intracerebral (nigral e ventricular) de PLA₂, já que a mesma antagonizou o aumento da locomoção induzida por apomorfina (efeito que ocorre através de um agonismo direto de receptores DA pós-sinápticos) (Gattaz e Brunner, 1996). Esses resultados são compatíveis com experimentos *in vitro*, nos quais a PLA₂ inibiu a ativação da adenilato ciclase (modulada por receptores DAs)

em tecido estriatal (Anand-Srivastava e Johnson, 1981) e reduziu em 82 % a afinidade dos receptores DAs D₂ à ³H-Espiperona em membranas sinaptossomais de ovelhas (Oliveira et al., 1984). Tais resultados sugerem que um aumento na atividade da PLA₂ levaria a uma diminuição na transmissão DA no CPF, o que estaria de acordo com a hipótese da hipofrontalidade em esquizofrenia (Gattaz e Brunner, 1996).

Um estudo *post mortem*, em estriado de usuários de cocaína, apresentou uma diminuição na atividade da PLA₂, devendo haver uma ligação entre essa enzima e a transmissão DA nessa região, já que é uma área de alta densidade de receptores DAs. Essa diminuição não foi observada em outras áreas estudadas (córtices frontal e occipital, cerebelo e substância branca subcortical) (Ross et al., 1996). Em um estudo mais recente (Ross et al., 2002), esse achado foi confirmado, tanto com o uso de cocaína, como de metanfetamina, sugerindo que a exposição crônica a drogas dopaminérgicas psicoestimulantes deve causar uma inibição compensatória de PLA₂ em áreas ricas em dopamina.

Além desses estudos, Myers e colaboradores (2001) encontraram que o uso crônico de haloperidol (1,0 mg/kg intra peritoneal, durante 21 dias), em ratos, inibe a transdução de sinal mediada pela PLA₂ em circuitos DAs mesocorticolímbicos e nigroestriatais, sem uma concomitante alteração na sinalização em regiões não DAs (como córtex occipital e núcleo talâmico). Por outro lado, um estudo, também realizado em ratos (Grinder et al., 2003), encontrou que a inibição da atividade da PLA₂ (com BEL), resultou em uma diminuição da afinidade aos receptores D₁. Esse efeito aparentemente oposto entre a PLA₂ e os receptores DAs, nos trabalhos de Myers e Grinder, é devido, provavelmente, a uma ação diferenciada da PLA₂ sobre os receptores

D₁ e D₂. Outro trabalho recente (Bhattacharjee et al., 2005), realizado em rato, *in vivo*, também apresentou uma relação entre a atividade da PLA₂ e receptores DAs. Foram administrados, intravenosamente, agonistas dos receptores D₁ (SKF-38393 – 5,0 mg/kg), e dos receptores D₂ (quinpirol – 1,0 mg/kg), para então verificar suas influências sobre a incorporação de AA em 61 regiões do cérebro de rato. Houve aumento na incorporação de AA com o uso de quinpirol em regiões ricas em receptores da família D₂, como néo-córtex, estriado, glóbus pálido, tálamo e substância negra pars compacta. Todavia, não foram observadas alterações na incorporação de AA com o uso de SKF-38393 em nenhuma das 61 regiões investigadas. Esses dados indicam que receptores da família D₂ medeiam a ativação da PLA₂, já que esta é a responsável pela liberação de AA dos fosfolípidos de membrana.

A lisoPC (produto de quebra pela ação da PLA₂) diminuiu a densidade de receptores D₁ e D₂, em tecido estriatal de rato (Lee et al., 2004). Não houve alteração com relação à afinidade de ligação desses receptores aos respectivos radioligantes utilizados, ³H-SCH 23390 (D₁) e ³H-YM 09151 2 (D₂). Outro estudo com lisoPC (Lee et al., 2005), em ratos, mostrou que a inibição intraventricular de lisoPC aumentou a dopamina estriatal em cerca de 20 %, e diminuiu os níveis dos metabólitos DAs, DOPAC (ácido 3,4-dihidroxifenil acético) e HVA (ácido homovanílico), indicando assim, uma conseqüente queda no “turnover” de dopamina no estriado. Os níveis de dopamina, DOPAC e HVA também foram medidos em córtex e hipocampo, porém, não foram encontradas alterações estatisticamente significativas nessas regiões. Apesar desses dois estudos de Lee e colaboradores terem sido feitos em modelos de Parkinson, essa relação entre a lisoPC e receptores DAs em estriado, também pode ser importante

para entender o que acontece em esquizofrenia. Como descrito anteriormente, há uma série de trabalhos sobre alterações tanto no sistema DA (Abi-Dargham et al., 2000; Kapur e Seeman, 2001; Yokoi et al., 2002; Guo et al., 2003), como na atividade da PLA₂ (Gattaz et al., 1995b; Ross et al., 1999; Lasch et al., 2003; Smesny et al., 2005) nessa doença.

Para esclarecer um pouco mais se há alguma relação entre a atividade da PLA₂, bem como o metabolismo dos fosfolípidos de membrana (que provavelmente tem uma relação direta com a atividade da PLA₂ alterada) e receptores DAs, no presente trabalho foi proposto verificar quais os efeitos da atividade da PLA₂ sobre os receptores D₁ e D₂, em tecido cerebral *post mortem* de humanos e, com base nos resultados, discorrer sobre as possíveis implicações desses achados em esquizofrenia.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostras

Este estudo foi realizado com amostras de tecido cerebral humano *post mortem* coletadas no Serviço de Verificação de Óbitos da Capital (SVOC), e obteve aprovação prévia da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq). Também foi obtida aprovação do SVOC e dos familiares de cada indivíduo.

Para a realização do projeto, primeiramente, foram coletadas amostras de 10 sujeitos neurologicamente saudáveis, do hemisfério esquerdo, de três regiões cerebrais: estriado (putamen e núcleo caudado), CPF (total) e CT (superior e medial). Após a coleta, as amostras eram colocadas em gelo seco, para acondicionamento até serem armazenadas em “freezer” – 70 °C no Laboratório de Neurociências – LIM 27, localizado no Instituto de Psiquiatria da FMUSP. Todos os experimentos deste trabalho foram realizados neste laboratório.

4.2 Critérios de inclusão e exclusão

Critérios de inclusão: indivíduos adultos com faixa etária entre 18 - 80 anos, intervalo *post mortem* de 10 - 24 h, de ambos os sexos. Critérios de exclusão: tumor encefálico, acidente vascular cerebral (AVC), doenças infecciosas, abuso de álcool ou

drogas e lesões cerebrais que possam afetar o estudo. O parecer foi fornecido pelo médico patologista responsável pelo laudo dos indivíduos analisados neste estudo.

4.3 Coleta das amostras

Para a realização das coletas houve a colaboração de médicos patologistas do SVOC. As coletas foram realizadas durante o período de autópsia desses sujeitos. Os cérebros foram retirados por técnicos do SVOC e passaram por uma primeira avaliação do patologista responsável, o qual nos informava se o sujeito havia sofrido alguma lesão cerebral visível, e também se sofria de alguma doença infecciosa (como AIDS), ou se fizera uso de álcool ou drogas (através da análise de outros órgãos). Outros dados, acerca da causa óbito e doença principal, idade, horário do óbito e da autópsia, foram adquiridos alguns dias após a coleta, em um laudo *post mortem* emitido pelo SVOC (Tabela 2). Nas primeiras coletas também contamos com a colaboração do patologista para a realização do corte coronal, com a localização adequada para a dissecação do estriado. Todas as dissecações foram realizadas com a colaboração de duas colegas de laboratório (Dra. Evelin L. Schaeffer e Isis A. Zainaghi). Além do auxílio do patologista, utilizamos um Atlas neuroanatômico (Jennes et al., 1995) para realizar as dissecações. Esses indivíduos tinham a idade de 65 ± 11 anos e intervalo *post mortem* de 13 ± 3 h, sendo um total de 6 homens e 4 mulheres.

Tabela 2: Dados *post mortem* sobre os sujeitos deste estudo.

Sujeito (sexo)*	Idade (anos)	IPM** (h)	Doença principal	Causa óbito
1 (M)	81	13	Miocardioesclerose	Edema pulmonar
2 (M)	71	9,5	Arterioesclerose coronariana	Infarto agudo do miocárdio
3 (F)	65	13,5	Arterioesclerose coronariana	Infarto agudo do miocárdio
4 (F)	56	10	Miocardioesclerose	Edema pulmonar
5 (M)	64	16,5	Arterioesclerose coronariana	Infarto agudo do miocárdio
6 (M)	81	14	Infarto agudo do miocárdio	Tamponamento cardíaco
7 (M)	44	18	————	Tuberculose
8 (F)	59	11	————	Tromboembolismo pulmonar
9 (F)	65	12	Arterioesclerose coronariana	Edema pulmonar
10 (M)	61	13	————	Pneumonia bilateral

* M = masculino; F = feminino

** IPM = intervalo *post mortem*

4.4 Princípios gerais para a dosagem de receptores dopaminérgicos

O princípio do método é o uso de um ligante radioativo que apresente alta afinidade pelo sítio de ligação do receptor que estiver sendo investigado (Molinoff, 1999).

De uma forma geral, no procedimento experimental, o homogenato cerebral deve ser incubado com um radioligante apropriado tanto na ausência quanto na presença de um ligante de competição (droga não radioativa). A ligação observada na ausência de um ligante de competição é chamada de ligação total, na qual o radioligante liga-se, principalmente, ao receptor desejado, mas pode ligar-se também a outros compostos

presentes no meio, como proteínas, por exemplo. Já a ligação observada na presença da droga não radioativa é chamada de ligação inespecífica, na qual a concentração dessa droga deve ser bem maior (cerca de 100 a 1000 vezes) que a concentração do radioligante necessária para ligar-se a 50 % dos receptores, de forma que somente essa droga faça ligação com o receptor desejado, impedindo a ligação deste com o radioligante. A diferença entre a ligação total e a ligação inespecífica fornecerá a ligação específica ($LT - LI = LE$) (Molinoff, 1999; Fior, 1999).

4.5 Princípios gerais para a determinação da atividade da PLA₂

A atividade da PLA₂ é uma medida estimada da quantidade de AA marcado liberado através de uma reação na qual a PLA₂ atua cataliticamente sobre o substrato L- α -1-palmitoil-2-araquidonil-fosfatidilcolina, marcado com ¹⁴C (PC¹⁴C) na cauda araquidonil em *sn*-2 (Figura 7). A quantidade de AA é determinada através do ensaio rádio-enzimático (Flesh et al., 1985; Gattaz et al., 1995b), com leitura da radiação β emitida, em um contador de cintilação líquida.

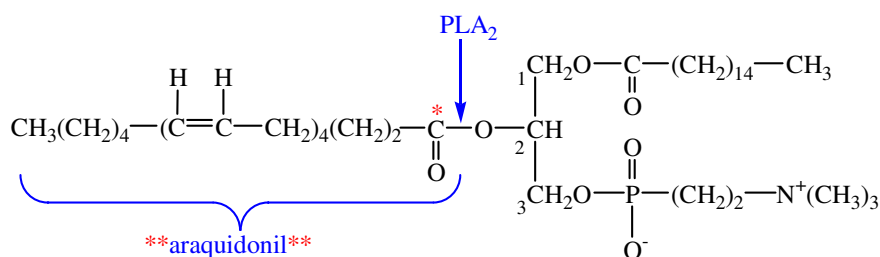


Figura 7: Clivagem do substrato PC¹⁴C pela PLA₂.

O ensaio rádio-enzimático é realizado com a adição de um substrato exógeno à amostra, podendo esta ser de tecido cerebral, de plaquetas, ou de cultura de células (Gattaz et al., 1995b; Ross et al., 1999). Nesse ensaio é muito importante utilizar um tampão de lise (Tris-HCl 5,0 mM) durante a homogeneização da amostra para romper as membranas e, assim, permitir a incorporação do substrato marcado aos fragmentos de membrana. Entretanto, no ensaio é necessário adicionar um tampão de lipossomos (Tris-HCl 50 mM) para simular um ambiente celular, unindo os fragmentos de membranas contendo o substrato marcado. A reação referente à ação catalítica da PLA₂ sobre o substrato ocorre durante um período de incubação a 37 °C. Após este período, a reação é interrompida e então, é realizada a extração do ácido graxo marcado.

4.6 Princípios gerais para a determinação da fluidez de membrana

A fluidez de membrana é determinada através de medida de anisotropia (ou polarização) por fluorescência. De acordo com esse método, moléculas fluorescentes são intercaladas no interior das membranas e são utilizadas para monitorar seu próprio movimento, o qual é restringido em diferentes graus, dependendo da mobilidade lipídica das membranas. Uma luz polarizada verticalmente excita as moléculas fluorescentes no interior das membranas, e a polarização (ou anisotropia) vertical e horizontal da emissão fluorescente é utilizada para caracterizar a fluidez de membranas. A anisotropia é inversamente proporcional à fluidez de membranas. Assim, a maior absorção de luz por uma molécula fluorescente com movimento mais restrito é seguida por uma maior emissão de luz (maior anisotropia), indicando uma fluidez de membranas reduzida, enquanto a menor absorção de luz por uma molécula fluorescente com movimento

menos restrito é seguida por uma menor emissão de luz (menor anisotropia), indicando uma fluidez de membranas aumentada (Toplak et al., 1990). Essa técnica é realizada com a utilização de moléculas fluorescentes, como DPH (1,6 - difenil - 1,3,5 - hexatrieno), TMA-DPH (1 - (4 - trimetilamoniofenil) - 6 - fenil - 1,3,5 - hexatrieno - *p* - toluenosulfonato) e pirene, que são intercaladas no interior da membrana, e fornecem medidas de fluidez de diferentes regiões: DPH, por ser uma molécula rica em lípidos, insere-se no centro da membrana; TMA-DPH, um derivado do DPH, apresenta uma cabeça polar, permanecendo entre as cabeças hidrofílicas da membrana (Bondy et al., 1990); Pirene, que fornece duas medidas de fluidez: fluidez lipídica total (“bulk”) e fluidez de lípidos adjacentes a proteínas (“annular”) (Avdulov et al., 1997).

4.7 Preparação das amostras de tecido cerebral

a) Para PLA₂ e fluidez de membranas com homogenato total

As amostras foram dissecadas, separando a substância cinzenta, o mais rápido possível para evitar perda da atividade enzimática (etapa comum a todos os ensaios). A substância cinzenta foi homogeneizada em 10 vezes o volume de tampão Tris-HCl 5,0 mM, pH 7,4 (em relação ao peso bruto do tecido original), usando um homogeneizador mecânico (Potter) a 1100 rpm. Foram separadas três alíquotas (1,0 mL cada) para a determinação da atividade da PLA₂ e três alíquotas (300 µL cada) para a determinação da fluidez de membrana, armazenando em “freezer” -70 °C.

b) Para receptores dopaminérgicos

Para cada ensaio de receptores o tecido cerebral foi homogeneizado (a massa dependeu da região estudada) em 12 mL de tampão de incubação gelado (Tris-HCl 50 mM + NaCl 120 mM, pH 7,4) em homogeneizador mecânico a 1100 rpm. Nesses ensaios as amostras deviam ser preparadas e utilizadas no mesmo dia.

4.8 Experimentos de padronização dos receptores dopaminérgicos D₁ e D₂

O ensaio rádio-receptor utilizado neste trabalho foi o de preparações de homogenatos de tecido cerebral *post mortem* de humanos, e o método de separação do complexo RL* formado foi o de filtração por meio de papéis de filtro de fibra de vidro.

4.8.1 Procedimento comum a todos os ensaios (curvas de proteína, de inibição e de saturação)

Radioligantes utilizados nestes experimentos: ³H-SCH 23390 (Amersham-Biosciences, Piscataway, NJ) para D₁, ³H-Espiperona (Amersham-Biosciences) e ³H-(-)-Sulpirida (PerkinElmer, Boston, MA) para D₂. Foi necessário usar uma substância (ketanserina – Tocris, Ellisville, MO) com alta afinidade aos receptores serotoninérgicos 5-HT₂, já que os radioligantes ³H-SCH 23390 e ³H-Espiperona também se ligam a estes receptores. Os compostos utilizados como drogas de competição foram: flufenazina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) para D₁ e haloperidol (Sigma-Aldrich) ou sulpirida (Sigma-Aldrich) para D₂. O volume de cada composto variou de acordo com o receptor e a região estudados. Cada ensaio foi realizado em triplicata em uma microplaca com 96 poços. A primeira triplicata continha a solução correspondente à ligação inespecífica,

composta pelo tampão de incubação, droga de competição, radioligante e suspensão de membrana. A outra triplicata, que corresponde à ligação total, foi composta pelo tampão de incubação, radioligante e suspensão de membrana. As misturas reacionais foram incubadas a 37 °C durante um período de 30 min. Filtrou-se rapidamente, utilizando papéis de filtro Whatman GF/C (Brandel, Gaithersburg, MD), previamente umedecidos com polietilenimina (0,5 %) por 15 min (para ensaios com receptores D₁ e D₂ em tecido cortical e também em estriado para D₁) ou papéis de filtro Whatman GF/B (Brandel), umedecidos com água destilada (para ensaios com receptores D₂ em estriado), lavando-os com tampão de lavagem gelado (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4). Todo o procedimento de filtração foi realizado com o uso do aparelho Cell Harvester. Os papéis de filtro foram cortados e colocados em tubos apropriados, adicionando 3,0 mL de líquido de cintilação biodegradável (OptiPhase 'HiSafe' 3 – PerkinElmer). Agitou-se os tubos vigorosamente, deixando-os em repouso por, no mínimo, 1 h para que o complexo RL* migrasse do papel de filtro para o líquido de cintilação, possibilitando a leitura referente à ligação do receptor ao respectivo radioligante, realizada no contador de cintilação líquida (Tri-Carb 2100 TR; Packard, Meriden, CT), onde foi feita a medida da radiação β emitida. Os resultados foram fornecidos em CPM, e posteriormente convertidos em concentração nanomolar (nM).

4.8.2 Determinação da concentração de proteína

Radioligantes utilizados: ^3H -SCH 23390 para D_1 e ^3H -Espiperone ou ^3H -Sulpirida para D_2 . A concentração de proteína variou de 2,6 a 21 mg/mL para D_1 e de 2,9 a 23 mg/mL para D_2 .

O esquema de pipetagem deste ensaio está apresentado na Tabela 3.

Tabela 3: Esquema de pipetagem na placa, onde cada célula corresponde a uma triplicata.

Droga 1	Total 1	Droga 2	Total 2
Droga 3	Total 3	Droga 4	Total 4
Droga 5	Total 5	Droga 6	Total 6
Droga 7	Total 7	Droga 8	Total 8

Todos os poços receberam 50 μL de radioligante, 50 μL da droga de competição (flufenazina 10 μM para D_1 , haloperidol 10 μM ou sulpirida 10 μM para D_2), para a ligação inespecífica, ou do tampão de incubação para a ligação total, e um volume de tampão de incubação para completar um volume final de 500 μL por poço, já que são pipetados diferentes volumes de homogenato cerebral. Nos ensaios de tecido cortical, também foi necessária a adição de 50 μL de ketanserina 100 nM. O restante do ensaio seguiu conforme o item 4.8.1.

4.8.3 Determinação do valor de IC_{50} usando ketanserina como inibidor

A ketanserina foi dissolvida em água ultrapura, e as concentrações de ketanserina utilizadas para a construção da curva de inibição foram: 0,3, 1,0, 3,0, 10, 30, 100, 300 nM; 1,0, 3,0, 10, 30 e 100 μM (total de 12 concentrações). Os radioligantes e as drogas de competição utilizados neste ensaio foram: ^3H -SCH 23390 0,3 nM e

flufenazina 10 μM para D_1 , e ^3H -Espiperone 0,3 nM e haloperidol 10 μM para D_2 . A concentração de proteína em tecido cortical foi de 10 mg/mL para D_1 e de 12 mg/mL para D_2 . O ensaio foi realizado de acordo com as Tabelas 5 e 6.

Tabela 4: Volume de cada composto pipetado em cada poço da placa.

Receptor	D_1	D_2
Tampão de incubação	150 μL	100 μL
Tampão/droga/ketanserina	50 μL	50 μL
Homogenato	250 μL	300 μL
Radioligante	50 μL	50 μL

Tabela 5: Esquema de pipetagem na placa, com o uso do inibidor. Cada célula comporta uma triplicata; [I] = concentração do inibidor (ketanserina).

Droga	Total	[I1] = 0,3 nM	[I2] = 1,0 nM
[I3] = 3,0 nM	[I4] = 10 nM	[I5] = 30 nM	[I6] = 100 nM
[I7] = 300 nM	[I8] = 1,0 μM	[I9] = 3,0 μM	[I10] = 10 μM
[I11] = 30 μM	[I12] = 100 μM	Droga	Total

O restante do ensaio foi feito conforme descrito no item 4.8.2.

A análise dos resultados foi realizada através da fórmula: ligação específica na presença do inibidor (%) = $(\text{Inibidor} - \text{Droga}) \times 100 / (\text{Total} - \text{Droga})$.

4.8.4 Determinação das curvas de saturação

A concentração de proteína utilizada variou de acordo com a região cerebral e receptor estudados. Os radioligantes foram ^3H -SCH 23390 para D_1 , ^3H -Espiperona ou ^3H -Sulpirida para D_2 . As drogas de competição não radioativas foram flufenazina 10 μM para D_1 , haloperidol 10 μM ou sulpirida 10 μM para D_2 . Foram utilizadas as seguintes concentrações de radioligante: 0,003, 0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1,0, 3,0 e 10 nM para D_1 , e

0,03, 0,1, 0,3, 1,0, 3,0, 7,0, 10 e 15 nM para D₂ (total de oito concentrações para cada receptor). Os ensaios foram realizados conforme mostrado na Tabela 6.

Tabela 6: Volume dos compostos pipetados em cada poço da placa (saturação).

receptor	Tecido cortical		Tecido estriatal	
	D ₁	D ₂	D ₁	D ₂
tampão	100 µL	50 µL	150 µL	100 µL
tampão/droga	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL
ketanserina	50 µL	50 µL	—	—
radioligante	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL
homogenato	250 µL	300 µL	250 µL	300 µL

O esquema de pipetagem foi o mesmo que aquele utilizado para determinação da concentração de proteína (Tabela 3), porém, neste caso, variou-se a concentração do radioligante. O restante do ensaio seguiu o mesmo padrão do item 4.8.1.

4.9 Determinação da atividade da PLA₂

4.9.1 Procedimento comum a todos os ensaios (curvas de proteína, substrato PC¹⁴C, tempo de incubação, pH, Ca²⁺, EDTA, BEL)

As amostras previamente armazenadas em “freezer” -70 °C foram descongeladas e mantidas sob gelo. Foi pipetado um volume de cada amostra, necessário para obter uma concentração de proteína de 1,5 mg/mL (exceto para a curva de proteína). A proteína foi determinada segundo o método de Lowry (1951). O volume no ensaio foi completado com Tris-HCl 5,0 mM, pH 7,4 e também foi adicionado Tris-HCl 100 mM, de forma que a proporção de Tris-HCl 5,0 mM + amostra/ Tris-HCl 100 mM fosse de 2:1 (o volume variou conforme o ensaio realizado). A amostra referente ao branco

continha um volume na proporção de 2:1 de Tris-HCl 5,0 mM e de Tris-HCl 100 mM. Cada amostra foi feita em triplicata. Após homogeneizar bem, foi pipetado em cada tubo: 100 µL de tampão/ CaCl₂/ EDTA/ BEL (Biomol, Plymouth Meeting, PA), 50 µL de Tris-HCl 1,0 M, 200 µL da amostra diluída (ou do branco) e 150 µL (0,075 µCi) do substrato radioativo PC-¹⁴C (PerkinElmer) ressuspenso em uma solução de albumina de soro humano (HSA) em água, onde [HSA] = 0,33 mg/mL. Homogeneizou-se novamente e a mistura reacional foi incubada por 30 min (exceto para curva de tempo de incubação) a 37 °C. Após a incubação, as amostras foram colocadas imediatamente em banho de gelo e foi adicionado 700 µL de solução de parada (isopropanol/ ácido clorídrico, na proporção de 12:1) para interromper a reação. Levou-se então, a temperatura ambiente por 10 min. Foi adicionado 700 µL de *n*-heptano, homogeneizando-se a mistura, a qual foi centrifugada a 4.000 rpm por 10 min a temperatura ambiente. Transferiu-se 500 µL da fase orgânica para tubos contendo 60 mg de sílica gel e 300 µL de *n*-heptano. Centrifugou-se novamente a 4.000 rpm por 10 min a temperatura ambiente. Transferiu-se 500 µL do sobrenadante para tubos contendo 6,0 mL de líquido de cintilação, homogeneizou-se, para então fazer a leitura no contador de cintilação líquida (Tri-Carb 2100 TR). Os resultados foram fornecidos em CPM, e então, corrigidos para pmol.mg/min.

4.9.2 Ensaio de otimização da atividade da PLA₂

Todos esses ensaios seguiram o procedimento descrito no item 4.9.1, com exceção das variáveis sob investigação. Ensaio para a construção de curvas de atividade da PLA₂ em função da concentração de substrato PC¹⁴C (0,04, 0,05, 0,06 e 0,075 µCi/mL); da concentração de proteína (0,5, 0,75, 1,0, 1,25, 1,5 e 1,75 mg/mL); do tempo de incubação (5, 15, 30, 45 e 60 min); do pH (6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5 e 9,0); da concentração de Ca²⁺ (100, 300 e 500 nM; 1,0, 10 e 100 µM; 1,0 e 50 mM); da concentração de EDTA (100 nM; 1,0, 10, 100 e 500 µM; 5,0 mM) e da concentração de BEL (100 e 300 nM; 1,0, 4,0, 7,0, 10, 20, 50, 100, 200, 250, 300, 400 e 500 µM).

4.10 Experimentos de estimulação e inibição da atividade da PLA₂

Para todas as amostras foram feitos ensaios de estimulação da PLA₂ (com o uso de EDTA 100 µM), inibição da PLA₂ (com o uso de BEL 100 µM), e também ensaios controles, sem utilizar qualquer agente que interferisse na atividade da enzima, ou seja, no lugar de EDTA ou BEL foi utilizado Tris-HCl 5,0 mM, pH 7,4.

Seqüência de pipetagem: (1) 100 µL Tris-HCl 5,0 mM / EDTA / BEL; (2) 50 µL Tris-HCl 1,0 M pH 7,5; (3) 200 µL branco / amostra (1,5 mg/mL); (4) 150 µL PC¹⁴C (0,075 µCi/mL).

O restante do experimento foi o mesmo descrito no item 4.9.1.

4.11 Preparações de membranas para a determinação de fluidez de membrana

4.11.1 Preparação de membranas totais

O tecido cerebral foi pesado e homogeneizado em 20 volumes de tampão Tris-HCl 5,0 mM e então centrifugado a 48.000 g por 20 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o “pellet” foi ressuscitado em 15 mL de Tris-HCl 5,0 mM. Centrifugou-se novamente a 48.000 g por 20 min a 4 °C e o “pellet” final foi ressuscitado no volume equivalente ao volume inicial de Tris-HCl 5,0 mM.

4.11.2 Preparação de membranas sinaptossomais

O tecido cerebral foi pesado e homogeneizado em 10 volumes de tampão Tris-HCl 5,0 mM, e então centrifugado a 1.000 g por 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e o “pellet” foi ressuscitado em 15 mL de Tris-HCl 5,0 mM. Centrifugou-se novamente a 1.000 g por 10 min a 4 °C e o “pellet” foi descartado. Os sobrenadantes foram unidos e centrifugados a 10.000 g por 20 min a 4 °C, para a obtenção de uma fração sinaptossomal bruta. O sobrenadante foi descartado e a fração sinaptossomal bruta foi ressuscitada em Tris-HCl 50 mM (para o tratamento da PLA₂ anterior ao experimento de anisotropia, esse preparado foi incubado nos diferentes tempos: 30 e 45 min, 1 e 1.5 h). Para o tratamento da PLA₂ durante o experimento de anisotropia, a fração sinaptossomal bruta foi centrifugada a 25.000 g por 20 min a 4 °C, e então a fração de membrana sinaptossomal foi obtida. O “pellet” final foi ressuscitado de acordo com o volume utilizado no início da preparação, em Tris-HCl 5,0 mM.

4.12 Experimentos de fluidez de membrana (com o uso da sonda DPH) ao estimular ou inibir a PLA₂

As suspensões de membrana foram preparadas dissolvendo-as em tampão Tris-HCl 5,0 mM, pH 7,4 para a concentração de proteína de 300 µg/mL. Também foi preparada a solução com a sonda fluorescente DPH 33 µM, em Tris-HCl pH 7,4, partindo-se de solução estoque 5,0 mM. Feito isto, foram pipetadas, em quintuplicata: 0,8 mL de Tris-HCl 5,0 mM, pH 7,4 + 0,1 mL da suspensão de membrana + 0,1 mL da solução da substância teste (EDTA/ BEL) ou tampão + 1,0 mL da solução fluorescente. Essa mistura foi homogeneizada por 10 segundos e incubada por 30 min a 37 °C. As leituras foram realizadas em um espectrofluorímetro (Photon Technology International – PTI, Mommouth Junction, NJ), com comprimento de onda de excitação $\lambda = 360$ nm e de emissão $\lambda = 450$ nm. Protocolo extraído do estudo sobre fluidez de membrana, realizado por Müller e colaboradores, 1997.

4.13 Experimentos de dosagem de receptores D₁ e D₂ ao estimular ou inibir a PLA₂

Estes ensaios também foram realizados com o uso de EDTA e BEL 100 µM (para induzir um estímulo e uma inibição na PLA₂, respectivamente). Para o ensaio controle foi utilizado tampão de incubação (Tris-HCl 50 mM + NaCl 120 mM, pH 7,4). Para cada amostra, os ensaios de ativação e inibição da atividade da PLA₂, e o ensaio controle foram realizados simultaneamente. Os ensaios foram feitos de acordo com a Tabela 7.

Tabela 7: Esquema de pipetagem para os receptores D₁ e D₂ em tecido cortical

Receptor	D ₁ (μL)	D ₂ (μL)
Tampão	50	—
Tampão / droga	50	50
Ketanserina	50	50
Tampão / EDTA / BEL	50	50
Membrana	250	300
Radioligante	50	50

Em estriado foi adicionado 50 μL de tampão de incubação no lugar de ketanserina. O restante do ensaio seguiu o mesmo procedimento descrito nos itens 4.8.1 e 4.8.4.

4.14 Análise estatística

Os gráficos resultantes dos experimentos para a dosagem de receptores e dos experimentos de inibição da PLA₂ foram obtidos através do programa “GraphPad® Prism”, versão 3,0. Cada gráfico foi originado através da média de 3 a 5 experimentos. O restante dos gráficos foi construído com o uso do programa “Microsoft Excel”, versão 7,0. A análise estatística foi feita com a utilização do programa “Statistical Package for Social Sciences” (SPSS), versão 10,0 para “Windows”. Os resultados foram apresentados como média ± desvio padrão do número de experimentos indicados nas figuras (capítulo 5 – Resultados). Foi utilizado o teste *t* de Student para amostras independentes. A significância estatística foi estabelecida em $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Padronização dos ensaios de receptores dopaminérgicos

5.1.1 Determinação da melhor concentração de ketanserina para inibir a ligação aos receptores serotoninérgicos (5-HT_{2A})

Foram encontrados valores de IC₅₀ de 3,3 nM e 0,3 μM para inibir a ligação de ³H-SCH 23390 aos receptores 5-HT_{2A} e D₁, respectivamente (Figura 8a). A extrapolação da curva para a concentração de ketanserina que bloqueia completamente a ligação de ³H-SCH 23390 aos receptores 5-HT_{2A} revelou um valor de aproximadamente 70 nM. Também pôde ser observado que a ligação do radioligante aos receptores 5-HT_{2A} representa 46 % neste tecido. Já no caso do radioligante ³H-Espiperona (Figura 5b), os valores de IC₅₀ foram de 4,5 nM e 5,0 μM, para inibir a ligação aos receptores 5-HT_{2A} e D₂, respectivamente. Dados de extrapolação da curva de receptores D₂ revelaram concentração de ketanserina de 60 nM para inibição total dos receptores 5-HT_{2A} (representando 74 % quando comparado aos receptores D₂).

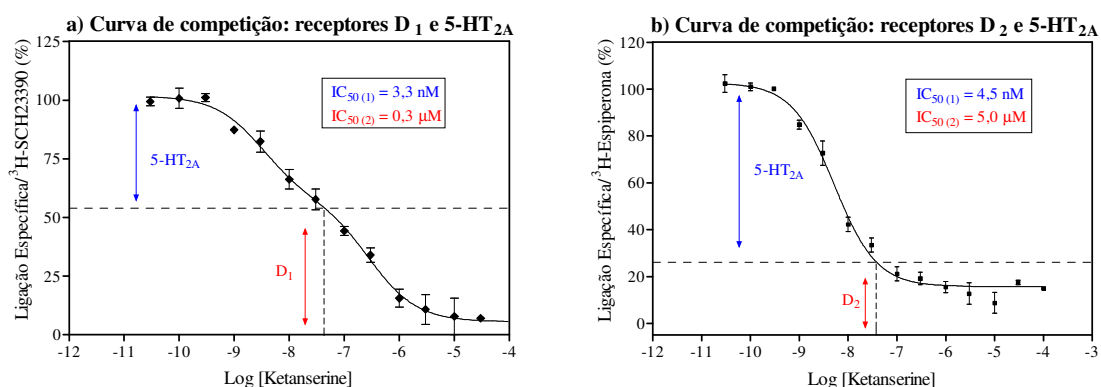


Figura 8: Curva de competição utilizando ketanserina como inibidor em tecido cortical humano. (a) Competição entre receptores D₁ e 5-HT_{2A}; (b) Competição entre receptores D₂ e 5-HT_{2A}. Dados obtidos de 5 experimentos, apresentando um modelo de dois sítios de competição.

5.1.2 Determinação da concentração ótima de proteína

Em tecido cortical, as melhores concentrações de proteína foram de 10 mg de peso bruto de proteína/ mL de tampão de incubação para os receptores D₁ (Figura 9a) e de 12 mg/mL para os receptores D₂ (Figura 9b).

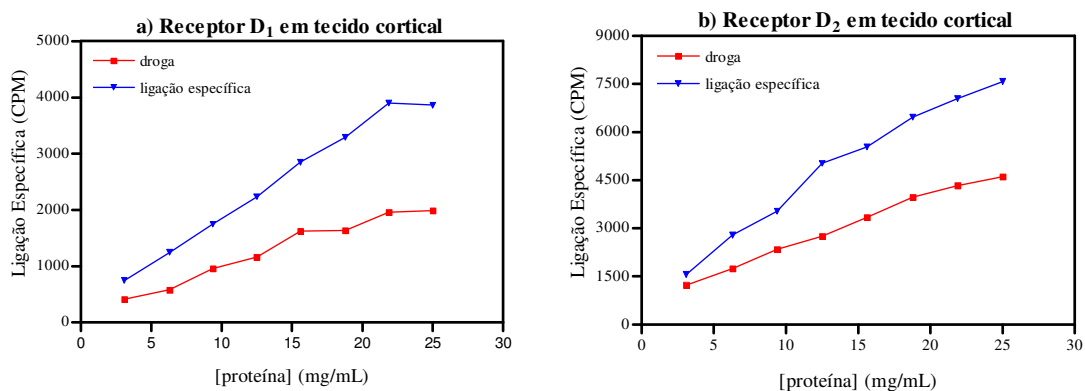


Figura 9: Dependência de proteína em tecido cortical humano. (a) Para receptores D₁ com ³H-SCH 23390; (b) Para receptores D₂ com ³H-Espiperona. Dados obtidos de 4 experimentos.

Antes de determinar a concentração de proteína em tecido estriatal humano, foram realizados ensaios para verificar se seria preciso o uso de ketanserina nessa região.

Não houve necessidade de utilizar ketanserina (Figura 10) nos experimentos em tecido estriatal humano, para ambos os receptores (D_1 e D_2), já que as diferenças entre as curvas com e sem a utilização de ketanserina foram mínimas (cerca de 8,0 % para D_1 e de 5,0 % para D_2).

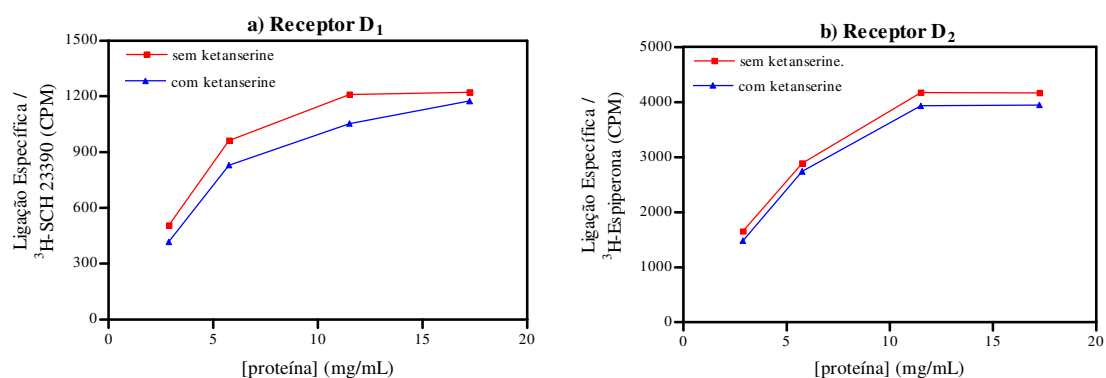


Figura 10: Comparação entre experimentos sem e com a presença de 100 nM de ketanserina em estriado humano. (a) Para receptores D_1 com $^3\text{H-SCH 23390}$; **(b)** Para receptores D_2 com $^3\text{H-Espiperona}$ em estriado. Dados de 3 experimentos.

As concentrações ótimas de proteína em tecido estriatal foram de 5,0 mg/mL para os receptores D_1 (Figura 11), 6,0 mg/mL (com $^3\text{H-Espiperona}$) e 12 mg/mL (com $^3\text{H-Sulpirida}$) para os receptores D_2 (Figura 12).

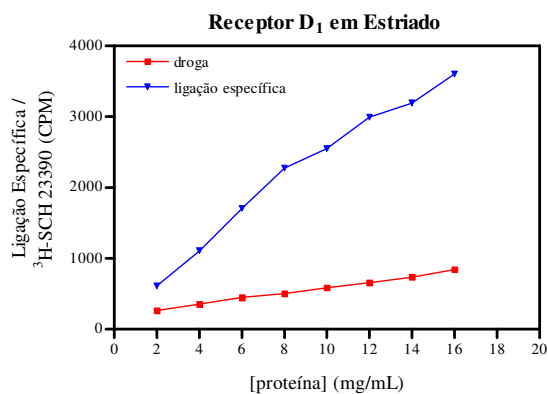


Figura 11: Dependência de proteína para receptores D₁ com ³H-SCH 23390 em tecido estriatal humano. Dados obtidos de 4 experimentos.

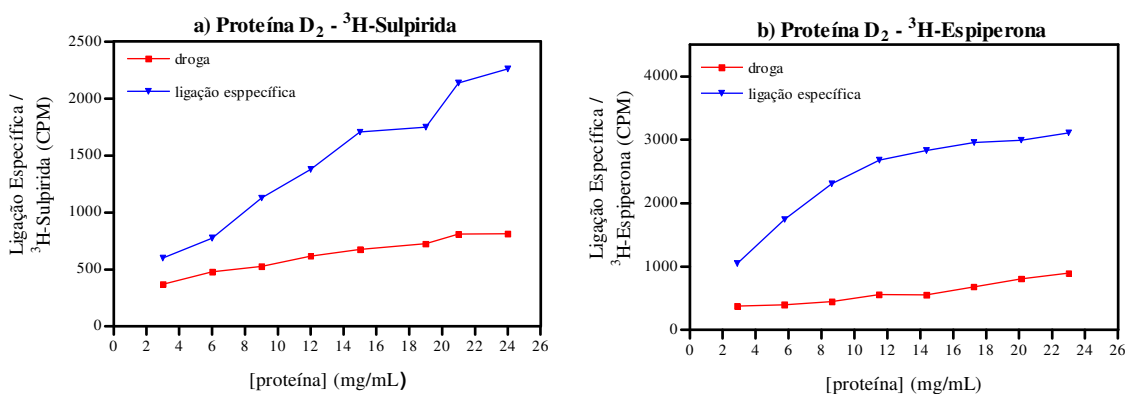


Figura 12: Dependência de proteína para receptores D₂ em tecido estriatal humano. (a) Com o uso de ³H-Sulpirida; (b) Com o uso de ³H-Espiperona. Dados obtidos de 4 experimentos.

5.1.3 Determinação de K_D e B_{max} dos receptores D₁ e D₂

As constantes de afinidade encontradas em tecido cortical foram K_D = 1,5 nM (D₁ em CPF) e K_D = 1,6 nM (D₁ em CT). Os valores referentes à densidade de

receptores foram $B_{\max} = 23$ fmol/mg proteína e $B_{\max} = 26$ fmol/mg proteína para os receptores D_1 em CPF e CT, respectivamente (Figuras 13 e 14).

Para os receptores D_2 , conforme a Figura 15, observa-se que, tanto em CPF como em CT, a saturação não foi alcançada. Este mesmo perfil foi encontrado com o uso de concentrações maiores de radioligante (^3H -Espiperona), bem como com o uso de diferentes tempos, temperaturas e tampões de incubação (inclusive com a adição de ácido ascórbico 0,1 %, o qual é um agente antioxidante). Foi realizado o total de 10 experimentos.

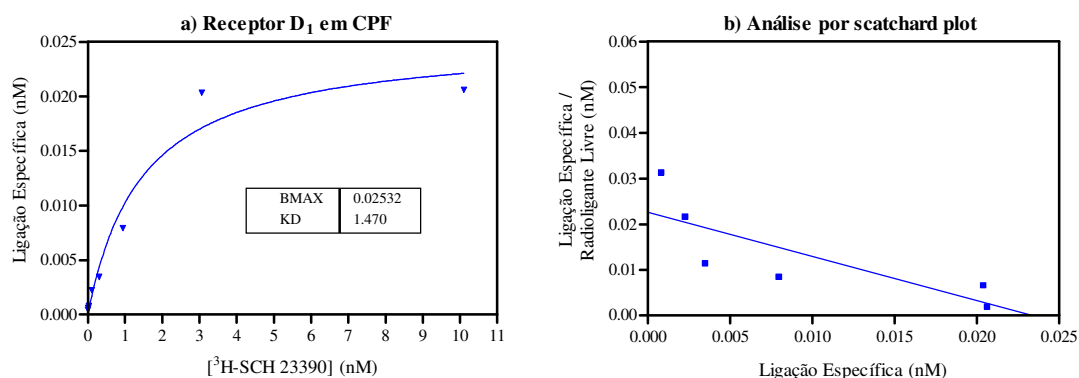


Figura 13: Experimento de saturação para receptores D_1 em CPF humano. (a) Curva de saturação da ligação entre ^3H -SCH 23390 e receptores; **(b)** Regressão linear dos dados da curva de saturação usando a análise de scatchard plot. Dados de 4 experimentos.

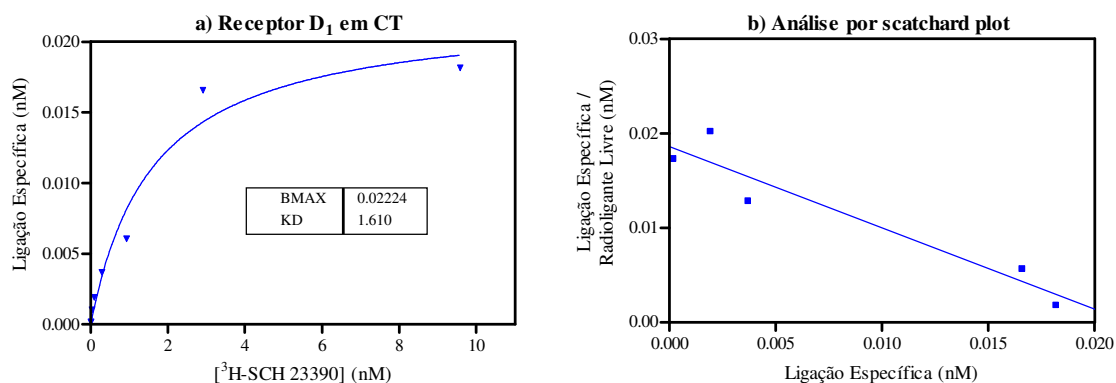


Figura 14: Experimento de saturação para receptores D₁ em CT humano. (a) Curva de saturação da ligação entre ³H-SCH 23390 e receptores D₁; **(b)** Regressão linear dos dados da curva de saturação usando a análise de scatchard plot. Dados de 5 experimentos.

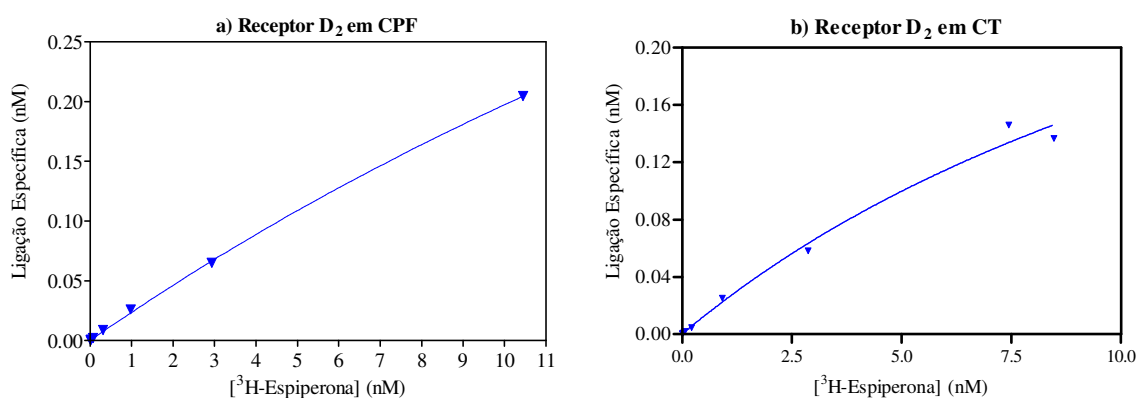


Figura 15: Curva de saturação da ligação entre ³H-Espiperona e receptores D₂ em tecido cortical humano. (a) Em CPF; **(b)** Em CT. Dados de 10 experimentos.

Em tecido estriatal, foram encontrados valores de $K_D = 1,1$ nM e $B_{max} = 126$ fmol/mg proteína para os receptores D₁ (Figura 16). Para receptores D₂ foram encontrados valores de $K_D = 7,2$ nM e de $B_{max} = 104$ fmol/mg proteína com o uso de ³H-Sulpirida (Figura 17), e não foi possível obter curvas de saturação ao utilizar ³H-

Espiperona (Figura 18), com exceção de um único experimento, que forneceu $K_D = 2,0$ nM e $B_{\max} = 297$ fmol/mg proteína, mas que não foi reproduzível.

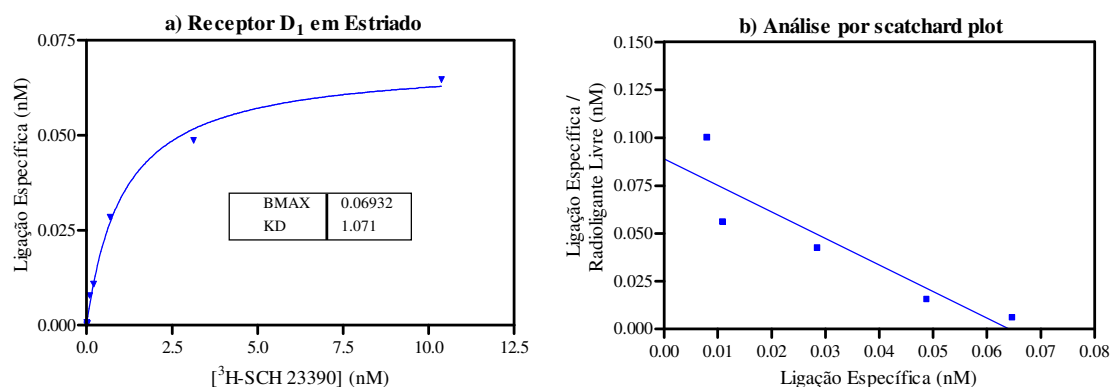


Figura 16: Experimento de saturação para receptores D₁ em estriado humano. (a) Curva de saturação da ligação entre $^3\text{H-SCH 23390}$ e receptores D₁; (b) Regressão linear dos dados da curva de saturação para D₁, usando a análise de scatchard plot. Dados de 4 experimentos.

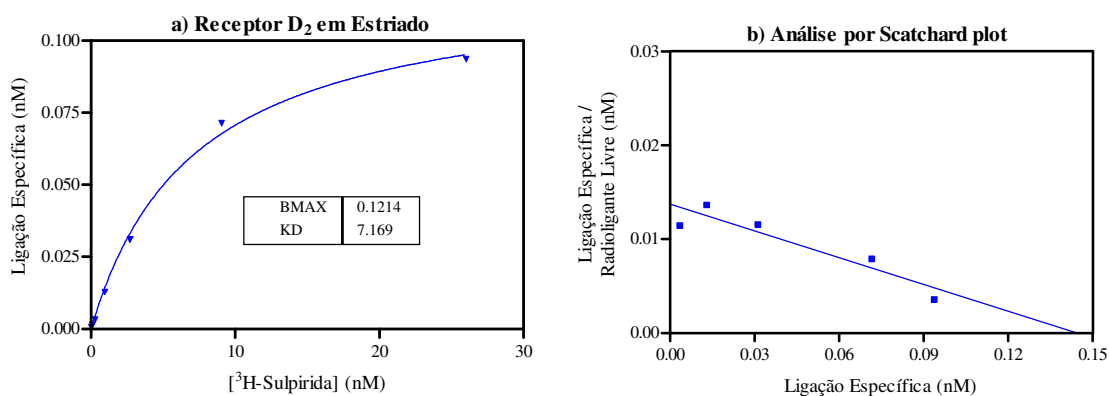


Figura 17: Experimento de saturação para receptores D₂ em estriado humano. (a) Curva de saturação da ligação entre $^3\text{H-Sulpirida}$ e receptores D₂; (b) Regressão linear dos dados da curva de saturação para D₂, usando a análise de scatchard plot. Dados de 4 experimentos.

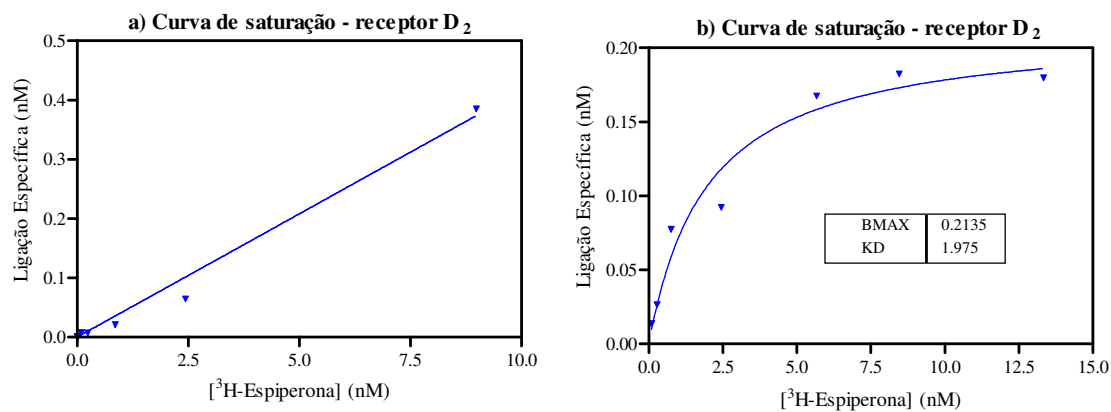


Figura 18: Curva de saturação da ligação entre ³H-Espiperona e receptores D₂ em estriado humano. (a) Ensaio com condições experimentais semelhantes àquelas com ³H-Sulpirida; (b) Único ensaio a apresentar saturação para D₂ em estriado com ³H-Espiperona.

5.2 Otimização dos experimentos para determinar a atividade da PLA₂ e verificar quais subtipos estão presentes

5.2.1 Experimentos iniciais para a determinação da atividade da PLA₂ em córtex pré-frontal humano

Conforme a Figura 19, pode-se observar que a PLA₂ apresentou melhor atividade em um intervalo de tempo de incubação de 15 a 45 min. Para este experimento utilizou-se pH 8,5 e [Ca²⁺] = 5,0 mM. Os dados são uma média de sete amostras diferentes de tecido cerebral.

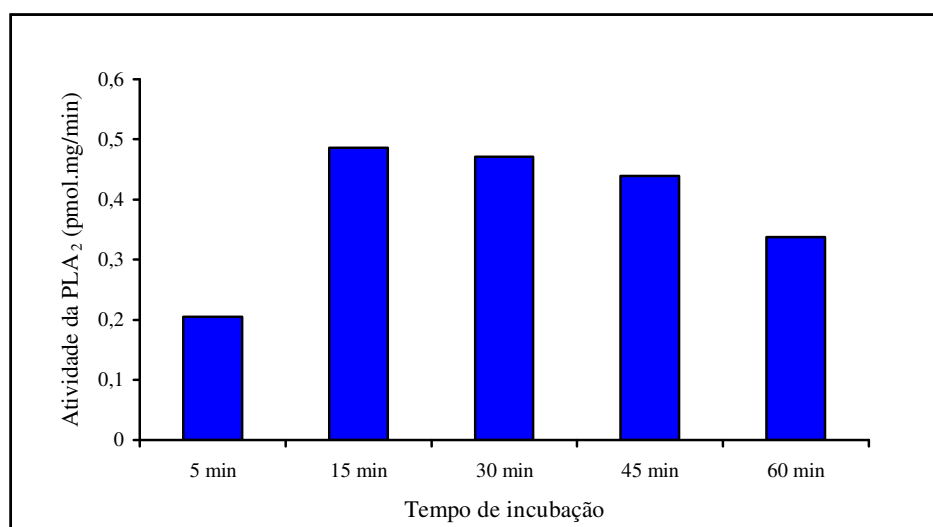


Figura 19: Curva de atividade da PLA₂ em função do tempo de incubação. Dados obtidos de 3 experimentos.

Houve uma certa linearidade na atividade da PLA₂ com as diferentes concentrações de Ca²⁺, com um leve aumento (cerca de 8,0 %) nas concentrações de 10 μM e 1,0 mM (Figura 20).

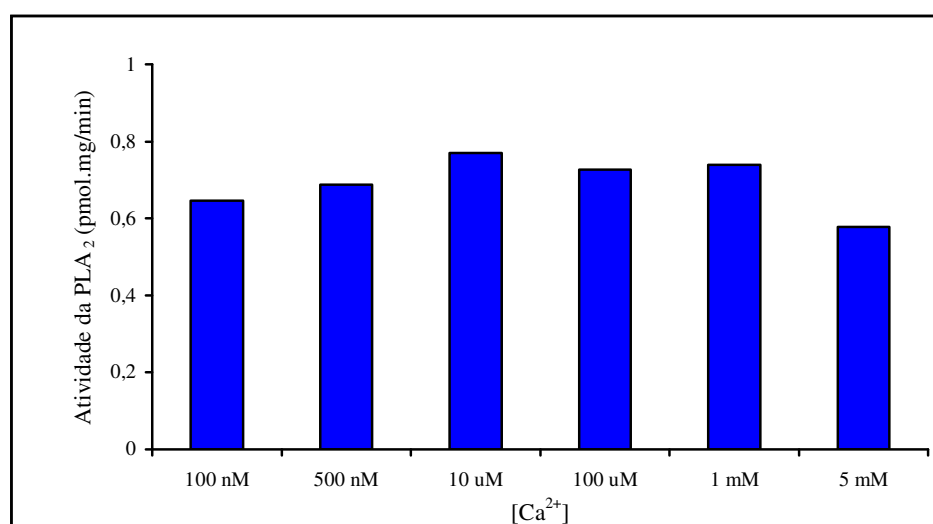


Figura 20: Curva de atividade da PLA₂ em função da concentração de Ca²⁺. Dados obtidos de 3 experimentos.

5.2.2 Estudos de inibição da PLA₂ em tecido cerebral de rato

A primeira curva de inibição foi construída com sete diferentes concentrações de E-6-(bromometileno)tetrahydro-3-(1-naftalenil)-2H-piran-2-ona (BEL), variando de 100 nM a 100 µM (100 e 300 nM, 1,0, 3,0, 10, 30 e 100 µM), e a concentração de Ca²⁺ foi de 5,0 mM. Essas concentrações foram insuficientes para produzir inibição total da PLA₂, bem como para apresentar dois sítios de ligação a fim de diferenciar valores de IC₅₀ para PLA₂GVI e PLA₂GII. Assim, foram construídas outras curvas de concentração de BEL, uma com Ca²⁺ = 5,0 mM (Figura 21a) e outra com EDTA = 5,0 mM (Figura 21b), nas quais foram acrescentadas outras concentrações de BEL, totalizando 13 pontos de concentração (100 e 300 nM, 1,0, 5,0, 7,0, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 100 e 300 µM).

Não houve diferença nos valores de IC₅₀ ao utilizar Ca²⁺ ou EDTA 5,0 mM. Porém, o uso de EDTA elevou a atividade da PLA₂ (Tabela 8), quando o esperado era uma queda na atividade, já que a ausência de Ca²⁺ impede a atividade da PLA₂GIV e das PLA₂ secretadas (PLA₂GIB, PLA₂GII, PLA₂GIII, PLA₂GV, PLA₂GX, PLA₂GXII e PLA₂GXIII), permitindo apenas a atividade da PLA₂GVI (comentários na discussão). Também pode ser observado que, nas condições deste ensaio, houve inibição total da atividade da PLA₂. Entretanto, ao repeti-lo nas mesmas condições, mas com o uso de Ca²⁺ 1,0 µM (ao invés de 5,0 mM), não houve inibição total da atividade da PLA₂, havendo saturação a partir de BEL = 100 µM, restando 9,0 % de atividade da enzima.

Tabela 8: Dados comparativos de atividade da PLA₂ com o uso de [Ca²⁺] = 5,0 mM e de [EDTA] = 5,0 mM.

[BEL]	Atividade da PLA ₂ (pmol.mg/min)	
	[Ca ²⁺] = 5,0 mM	[EDTA] = 5,0 mM
100 nM	3,25	6,13
300 nM	3,45	5,83
1,0 μM	3,17	5,18
5,0 μM	2,96	3,92
7,0 μM	2,36	3,30
10 μM	1,96	3,04
15 μM	1,42	2,28
20 μM	1,20	2,15
30 μM	0,83	1,81
40 μM	0,44	0,95
50 μM	0,24	0,46
100 μM	0,03	0,13
300 μM	0,02	0,09

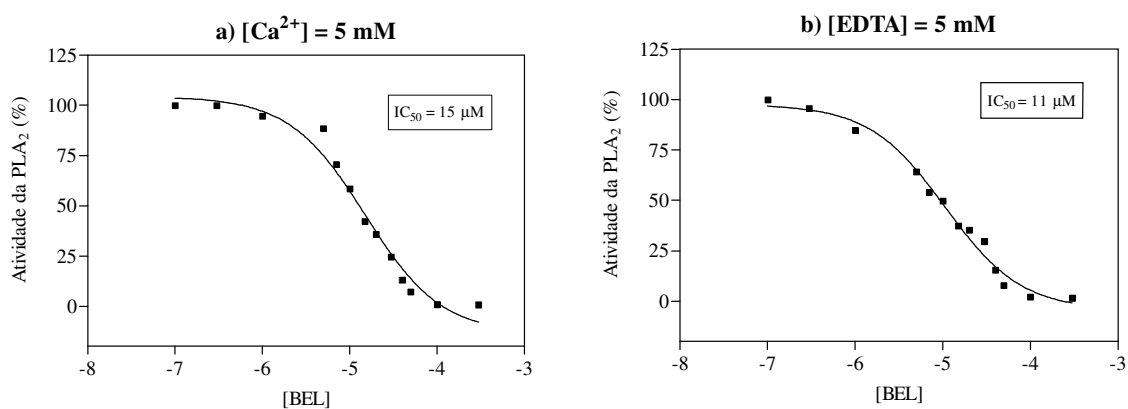


Figura 21: Curva de inibição da atividade da PLA₂GVI com BEL. (a) com o uso de [Ca²⁺] = 5,0 mM; (b) com o uso de [EDTA] = 5,0 mM. Dados obtidos de 3 experimentos.

5.2.3 Experimentos de determinação da atividade da PLA₂ em tecido cortical e estriatal humano

A atividade da PLA₂ foi maior ao utilizar a concentração de substrato (PC¹⁴C) de 0,075 µCi/mL. Já a melhor concentração de proteína para o desempenho dessa enzima foi de 1,5 mg/mL (Figuras 22 e 23, respectivamente).

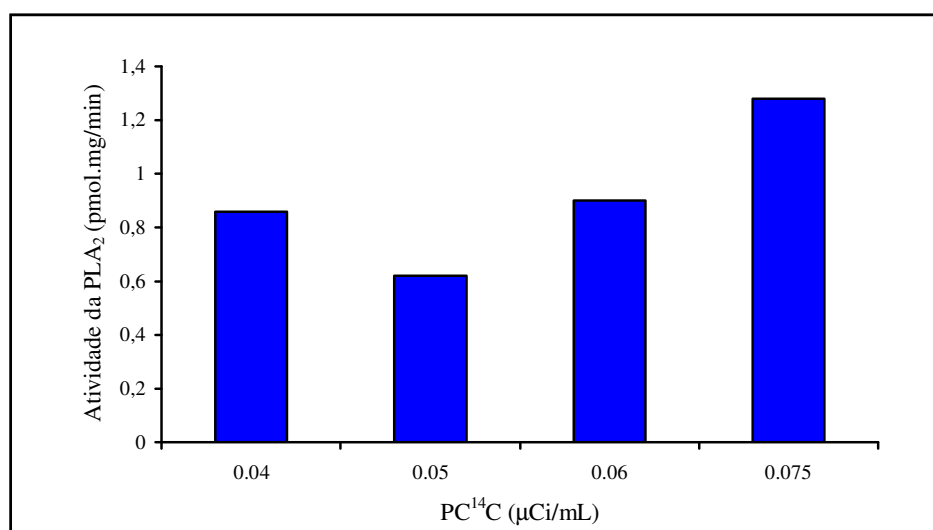


Figura 22: Curva de atividade da PLA₂ em função da concentração de substrato (PC¹⁴C) em tecido cortical humano. Dados obtidos de 3 experimentos.

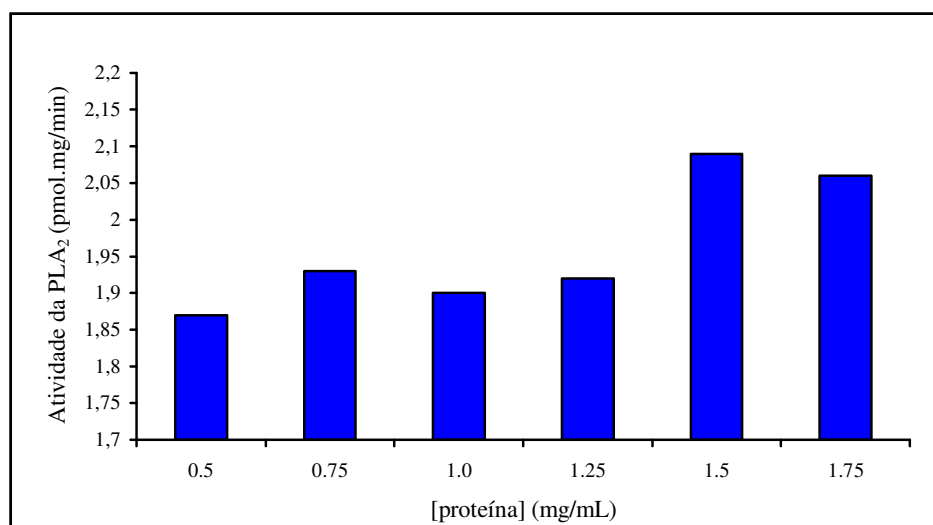
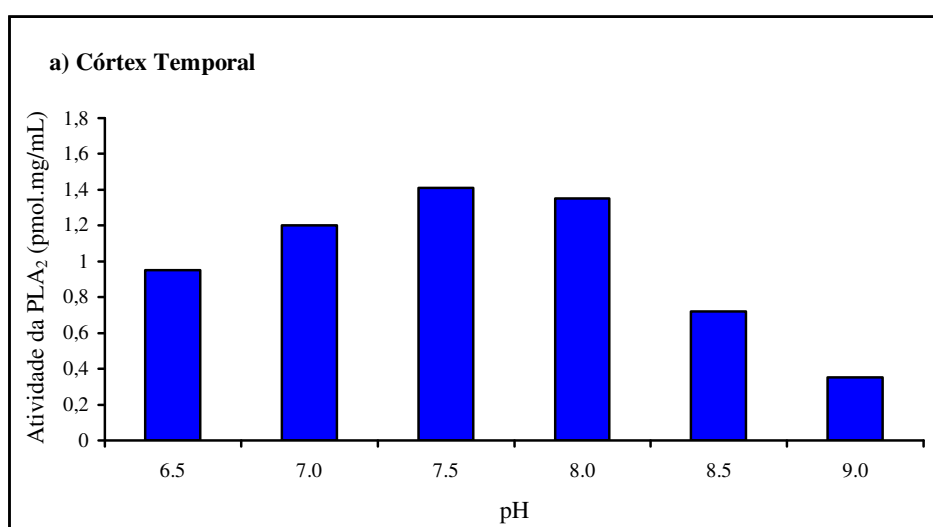


Figura 23: Curva de atividade da PLA₂ em função da concentração de proteína em tecido cortical humano. Dados obtidos de 3 experimentos.

Com relação ao valor de pH, houve aumento na atividade da PLA₂ em pH 7,5, sendo um pouco menor em pH 8,0. Porém, houve uma queda bem considerável em pH 8,5 (cerca de 62 %) e 9,0 (cerca de 85 %) (Figura 24).



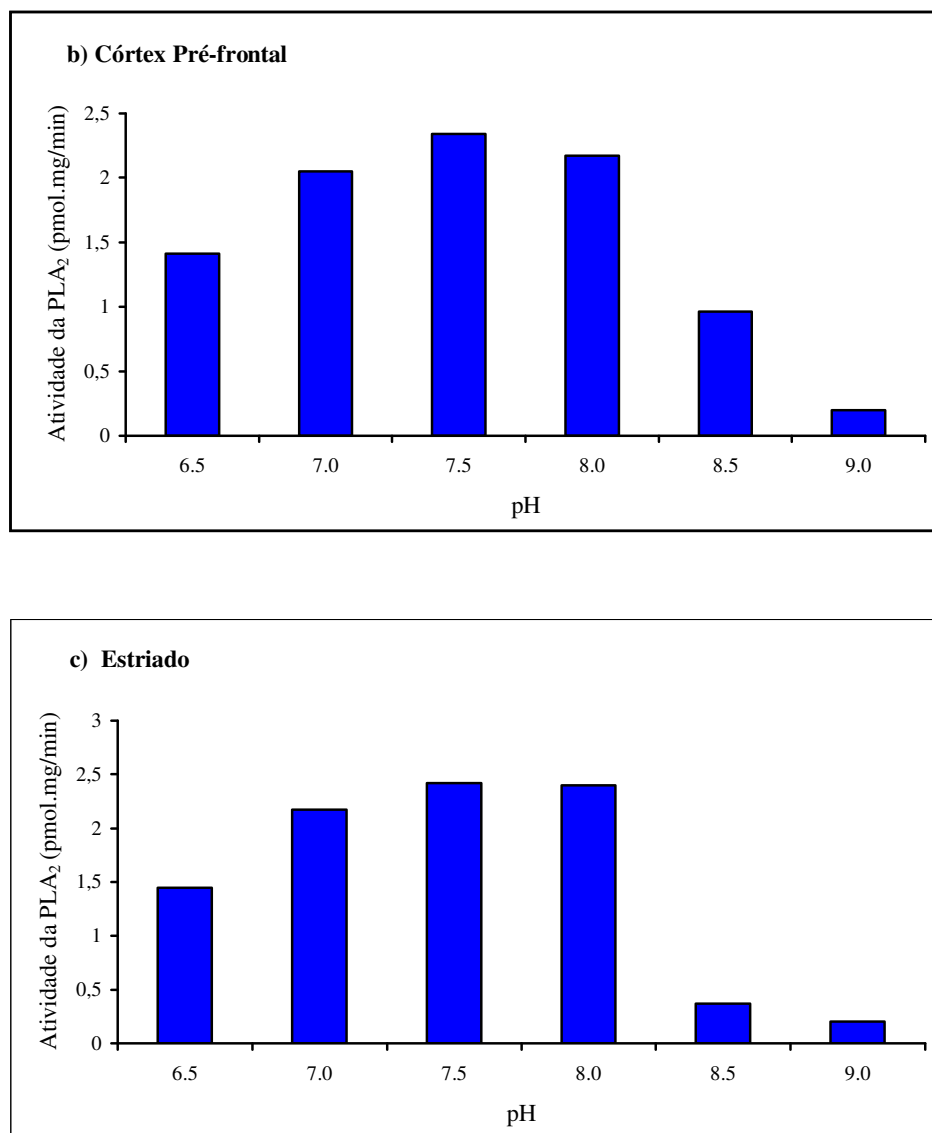


Figura 24: Curva de atividade da PLA₂ em função do pH em tecido cerebral humano. (a) Em Córtex Temporal; (b) Em Córtex Pré-Frontal; (c) Em estriado. Dados obtidos de 3 experimentos.

Ao observar a Figura 25, nota-se uma queda na atividade da PLA₂ nas concentrações de Ca²⁺ milimolares, e um leve aumento na atividade da PLA₂ conforme as concentrações de Ca²⁺ vão diminuindo, com atividade máxima ao quelar todo o Ca²⁺ com EDTA 450 μM.

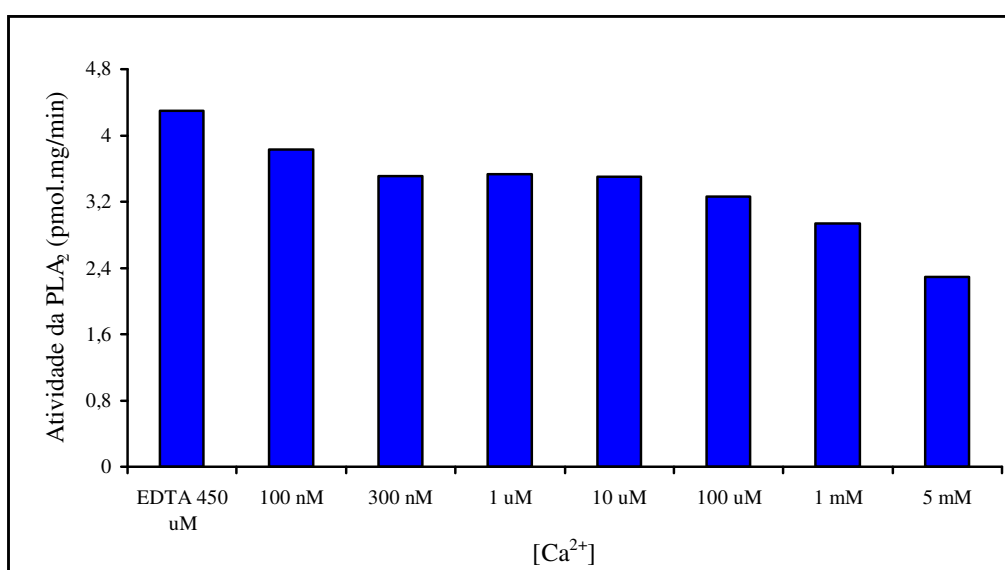


Figura 25: Curva de atividade da PLA₂ em função da concentração de Ca²⁺ em estriado humano. Dados obtidos de 3 experimentos.

Foram construídas curvas de inibição com BEL, em tecido cerebral humano. Foram utilizadas o total de 14 concentrações de BEL, variando de 100 nM – 500 μM (100 e 300 nM, 1,0, 4,0, 7,0, 10, 20, 50, 100, 200, 250, 300, 400 e 500 μM) com o uso de Ca²⁺ 10 μM e também de EDTA 1,0 mM (Figuras 26 e 27). As demais condições do ensaio foram: [proteína] = 1,5 mg/mL; [PC¹⁴C] = 0,075 μCi/mmol; pH 7,5 e tempo de incubação de 30 min. Nessas curvas foi possível notar a formação de um patamar nas concentrações de BEL entre 300 – 500 μM, onde houve uma inibição de 90 % (com

Ca^{2+} 10 μM) e de 85 % (com EDTA 1,0 mM) da PLA_2GVI . Baseada nesta curva, foi montada uma tabela (Tabela 9) com os valores de atividade da PLA_2 na presença de Ca^{2+} 10 μM e de EDTA 1,0 mM referentes a cada concentração de BEL utilizada e, novamente, pôde-se observar um aumento na atividade da PLA_2 na presença de EDTA.

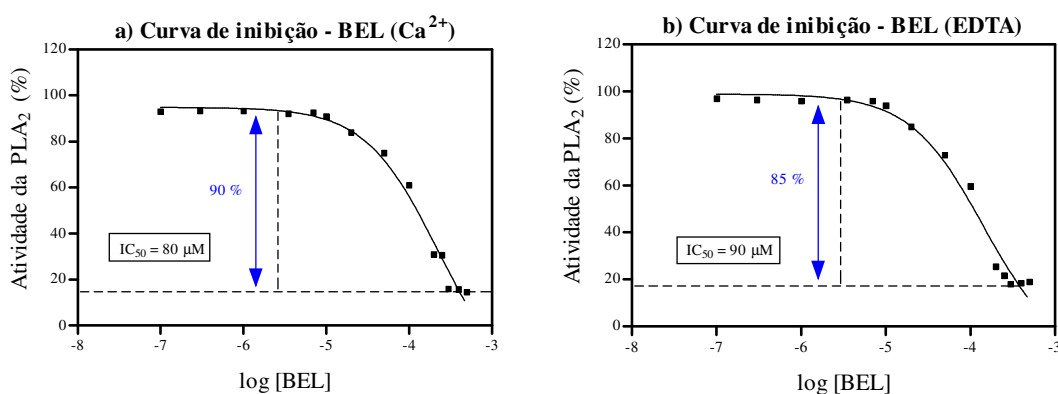


Figura 26: Curva de inibição da atividade da PLA_2GVI com BEL na presença de a) Ca^{2+} 10 μM ; b) EDTA 1,0 mM. Variação na concentração de BEL de 100 nM – 500 μM . Dados obtidos de 3 experimentos.

Tabela 9: Dados comparativos de atividade da PLA₂ com o uso de [Ca²⁺] = 10 μM e com o uso de [EDTA] = 1,0 mM

[BEL]	Atividade da PLA ₂ (pmol.mg/min)	
	[Ca ²⁺] = 10 μM	[EDTA] = 1,0 mM
100 nM	2,48	2,93
300 nM	2,49	2,91
1,0 μM	2,49	2,90
4,0 μM	2,46	2,91
7,0 μM	2,47	2,90
10 μM	2,43	2,83
20 μM	2,23	2,56
50 μM	2,01	2,47
100 μM	1,74	1,98
200 μM	0,55	0,55
250 μM	0,54	0,47
300 μM	0,37	0,39
400 μM	0,28	0,40
500 μM	0,26	0,49

Finalmente, foi construída de uma curva de atividade da PLA₂ em função da concentração de EDTA, onde a concentração ideal de EDTA para induzir uma ativação da PLA₂GVI foi de 100 μM.

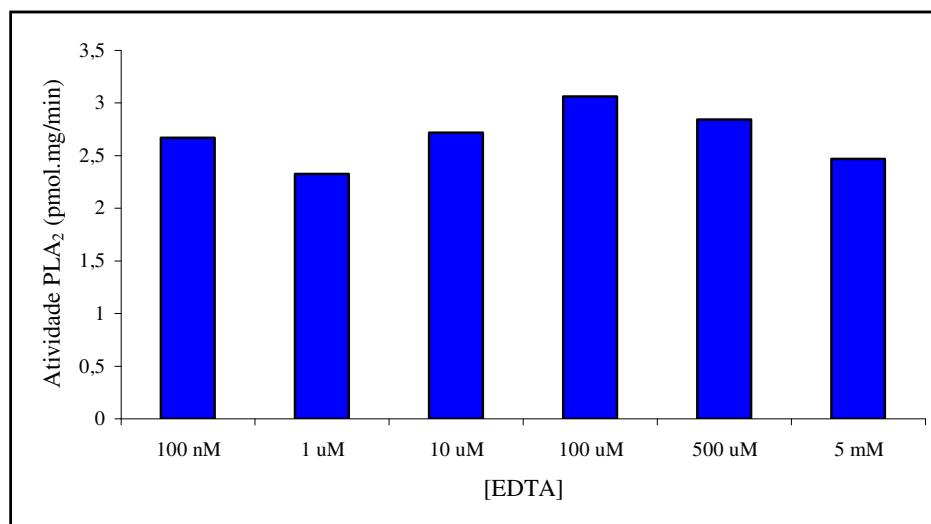


Figura 27: Curva de atividade da PLA₂ em função da concentração de EDTA em tecido cerebral humano. Dados obtidos de 3 experimentos.

5.3 Estimulação e inibição da PLA₂GVI

Os estudos de estimulação e de inibição da atividade da PLA₂GVI foram feitos em um total de 10 amostras, onde foram usados Tris-HCl 5,0 mM, pH 7,4 como controle, EDTA 100 μ M para induzir um aumento na atividade da PLA₂, e BEL 100 μ M como inibidor da PLA₂GVI. Os resultados dessa estimulação e inibição estão ilustrados na Figura 28, sendo que houve ativação de 9,0 % em CPF ($2,23 \pm 1,28$ vs $2,03 \pm 1,06$ pmol.mg/min, $p = 0,69$), 5,0 % em CT ($1,89 \pm 0,87$ vs $1,79 \pm 0,70$ pmol.mg/min, $p = 0,79$) e 14 % em estriado ($2,38 \pm 1,17$ vs $2,05 \pm 0,93$ pmol.mg/min, $p = 0,49$). A inibição foi de 88 % em CPF ($0,24 \pm 0,11$ vs $2,03 \pm 1,06$ pmol.mg/min, $p < 0,001$), 72 % em CT ($0,50 \pm 0,25$ vs $1,79 \pm 0,70$ pmol.mg/min, $p < 0,001$) e 78 % em estriado ($0,46 \pm 0,23$ vs $2,05 \pm 0,93$ pmol.mg/min, $p < 0,001$).

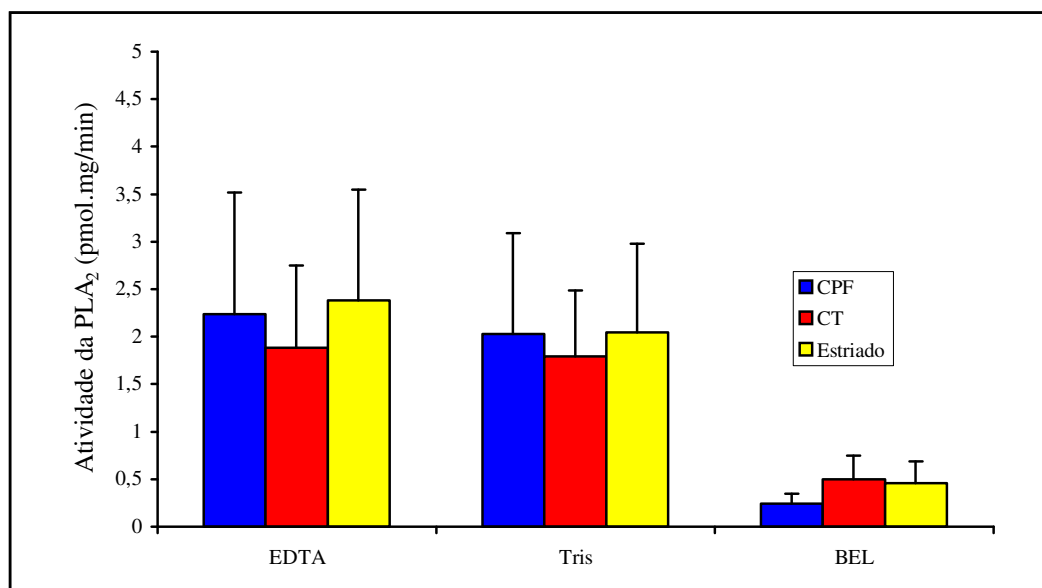


Figura 28: Estimulação e inibição da atividade da PLA₂GVI. Foram utilizados EDTA (para induzir aumento), BEL (para inibir) e Tris-HCl (controle) em CPF → ativação de 9,0 % (2,23 ± 1,28 vs 2,03 ± 1,06 pmol.mg/min, p = 0,69) e inibição de 88 % (0,24 ± 0,11 vs 2,03 ± 1,06 pmol.mg/min, p < 0,001); CT → ativação de 5,0 % (1,89 ± 0,87 vs 1,79 ± 0,70 pmol.mg/min, p = 0,79) e inibição de 72 % (0,50 ± 0,25 vs 1,79 ± 0,70 pmol.mg/min, p < 0,001); estriado → ativação de 14 % (2,38 ± 1,17 vs 2,05 ± 0,93 pmol.mg/min, p = 0,49) e inibição de 78 % (0,46 ± 0,23 vs 2,05 ± 0,93 pmol.mg/min, p < 0,001); n = 10.

Os valores percentuais tiveram como base os valores de atividade obtidos com o uso de tampão (Tris). Pôde ser observado que apenas os resultados da inibição (com BEL) foram significativos nas três regiões estudadas, entretanto, ao ativar a PLA₂GVI, embora tenha ocorrido um aumento percentual, o mesmo não chegou a ser significativo (p > 0,05).

5.4 Efeitos da atividade da PLA₂GVI na fluidez de membrana: ensaios de padronização

Em preparados de homogenatos totais, os resultados obtidos não apresentaram diferenças entre o uso dos agentes que influenciam na atividade da PLA₂GVI (EDTA – 0,2146 e BEL – 0,2141), e a condição controle (Tris – 0,2142). Assim, houve a necessidade de realizar alguns experimentos de padronização a fim de obter diferenças significativas ao induzir aumento ou ao inibir a PLA₂GVI.

A primeira condição verificada foi com relação ao tipo de membrana. Foram feitos ensaios com membranas totais e sinaptossomais. Além disso, a estimulação e a inibição da PLA₂ foram feitas antes do ensaio de fluidez de membrana (determinada através da medida de anisotropia), e antes também da preparação de membranas. Novamente não houve alteração entre os valores de anisotropia ao induzir aumento ou ao inibir a PLA₂ (membrana total: Tris – 0,2013, EDTA – 0,2005, BEL – 0,2006; membrana sinaptossomal: Tris – 0,1961, EDTA – 0,1974, BEL – 0,1955).

Outro fator testado foi o tempo de incubação, tanto durante a medida de anisotropia, como anterior à mesma. Essa condição foi verificada para ambas as membranas (total e sinaptossomal). Os tempos estudados foram de 30 min, 45 min, 1 h e 1,5 h. Para a membrana sinaptossomal, com estimulação e inibição da PLA₂ anterior à medida de anisotropia, e nos diferentes tempos de incubação, houve diferença nos valores de anisotropia em 45 min e 1,5 h apenas com o uso de BEL (Tabela 10). Para a mesma membrana, mas desta vez estimulando e inibindo a PLA₂ e alterando o tempo de incubação durante a medida de anisotropia, houve diferença (diminuição) nos valores

com o uso de EDTA (45 min) e com o uso de BEL (30 e 45 min) (Tabela 11). Todavia, as diferenças não foram significativas ($p > 0,05$).

Tabela 10: Valores de anisotropia em membranas sinaptossomais para os diferentes tempos de incubação, com estimulação ou inibição da PLA₂ antes do ensaio de anisotropia.

M. Sinaptossomal	Tris	EDTA	BEL
30 min	0,1868	0,1874	0,1860
45 min	0,1841	0,1822	0,1892
1 h	0,1898	0,1906	0,1865
1,5 h	0,1878	0,1863	0,1903

Tabela 11: Valores de anisotropia em membranas sinaptossomais para os diferentes tempos de incubação, com estimulação ou inibição da PLA₂ durante o ensaio de anisotropia.

M. Sinaptossomal	Tris	EDTA	BEL
30 min	0,1938	0,1918	0,1886
45 min	0,1960	0,1906	0,1921
1 h	0,1831	0,1812	0,1843
1,5 h	0,1860	0,1835	0,1859

Com relação aos resultados obtidos para as membranas totais, nos diferentes tempos de incubação, não houve alterações quando as membranas foram tratadas com EDTA/ BEL anteriormente ao ensaio de fluidez de membranas (Tabela 12).

Tabela 12: Valores de anisotropia em membranas totais para os diferentes tempos de incubação, com estimulação ou inibição da PLA₂ antes do ensaio de anisotropia.

M. Total	Tris	EDTA	BEL
30 min	0,1884	0,1834	0,1883
45 min	0,1968	0,1919	0,1930
1 h	0,1946	0,1890	0,1967
1,5 h	0,1943	0,1892	0,1901

5.5 Efeitos da atividade da PLA₂GVI nos receptores dopaminérgicos

Ao induzir aumento na atividade da PLA₂GVI o valor de K_D diminuiu, tanto em estriado ($K_D = 1,43 \pm 0,46$ vs $2,22 \pm 0,97$ nM, $p = 0,05$) (Figura 29a) como em CPF ($K_D = 3,5 \pm 1,07$ vs $4,8 \pm 0,81$ nM, $p = 0,005$) (Figura 30a), indicando aumento na afinidade de receptores D_1 à $^3\text{H-SCH 23390}$ (36 % - estriado, 44 % - CPF), porém não houve alteração em CT ($K_D = 2,46 \pm 0,87$ vs $2,7 \pm 1,36$ nM, $p = 0,66$) (Figura 31a). Ao inibir a enzima, houve aumento no valor de K_D , desta vez para as três regiões ($K_D = 3,60 \pm 1,24$ vs $2,22 \pm 0,97$ nM, $p = 0,03$ – estriado; $K_D = 7,2 \pm 2,3$ vs $4,8 \pm 0,87$ nM, $p = 0,007$ - CPF; $K_D = 4,79 \pm 1,96$ vs $2,7 \pm 1,36$ nM, $p = 0,02$ - CT), indicando diminuição na afinidade de D_1 à $^3\text{H-SCH 23390}$. Com relação aos valores de B_{\max} , os mesmos sofreram um aumento quando a atividade da PLA₂GVI foi estimulada, exceto em estriado ($B_{\max} = 186 \pm 79$ vs 187 ± 66 fmol/mg proteína, $p = 0,98$ – estriado; $B_{\max} = 149 \pm 49$ vs 105 ± 45 fmol/mg proteína, $p = 0,05$ - CPF; $B_{\max} = 94 \pm 32$ vs 69 ± 27 fmol/mg proteína, $p = 0,08$ - CT), enquanto que não houve alteração ao inibir a enzima ($B_{\max} = 183 \pm 71$ vs 187 ± 66 pmol/mg proteína, $p = 0,91$ – estriado; $B_{\max} = 91 \pm 41$ vs 105 ± 45 fmol/mg proteína,

$p = 0,47$ – CPF; $B_{\max} = 68 \pm 18$ vs 69 ± 27 fmol/mg proteína, $p = 0,95$ - CT) (Figuras 29b, 30b e 31b).

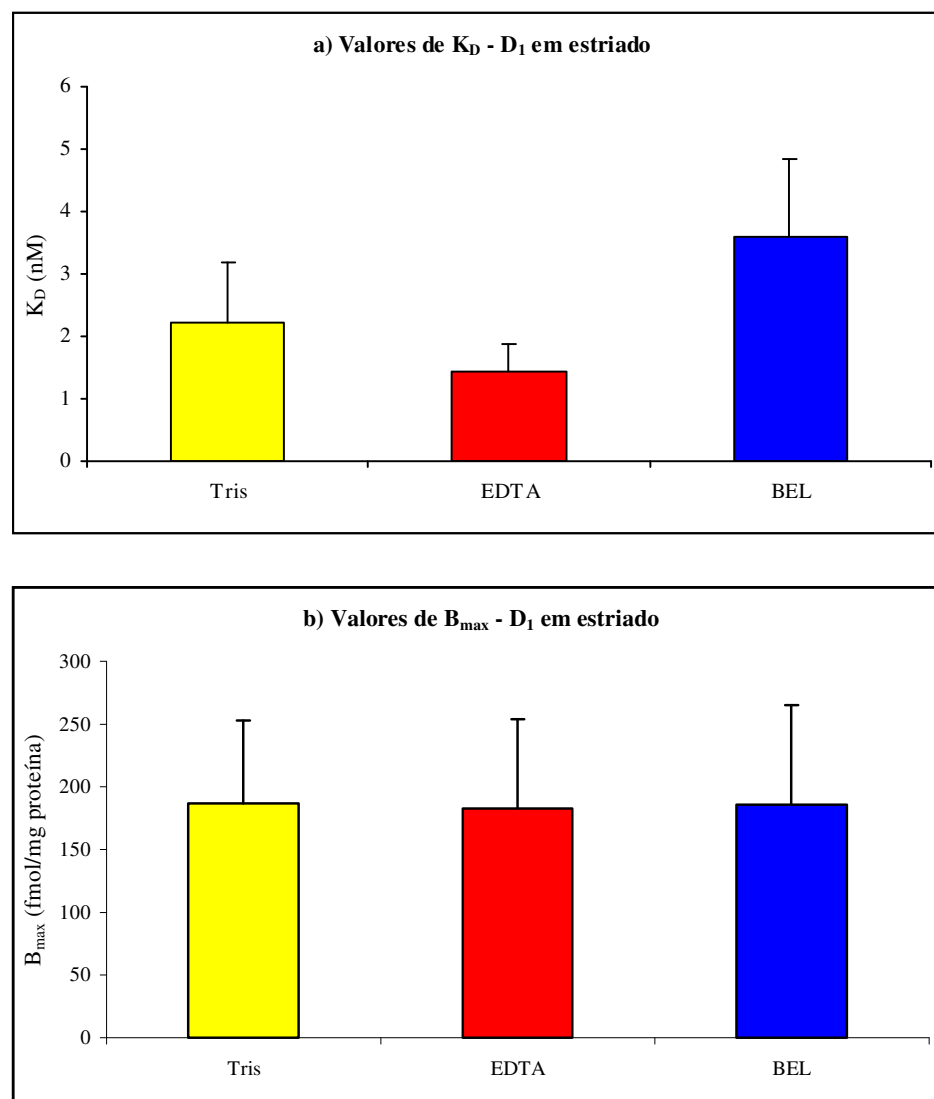


Figura 29: Efeitos da atividade da PLA₂GVI nos receptores D₁ em estriado. (a) Ao aumentar a atividade da PLA₂GVI (com EDTA), a afinidade de D₁ à ³H-SCH 23390 aumentou ($K_D = 1,43 \pm 0,46$ vs $2,22 \pm 0,97$ nM, $p = 0,05$) e, ao inibir a PLA₂GVI (com BEL), a afinidade de D₁ à ³H-SCH 23390 diminuiu ($K_D = 3,60 \pm 1,24$ vs $2,22 \pm 0,97$ nM, $p = 0,03$); (b) Densidade de receptores D₁ não alterou ao induzir um aumento ou ao inibir a PLA₂GVI, $n = 10$.

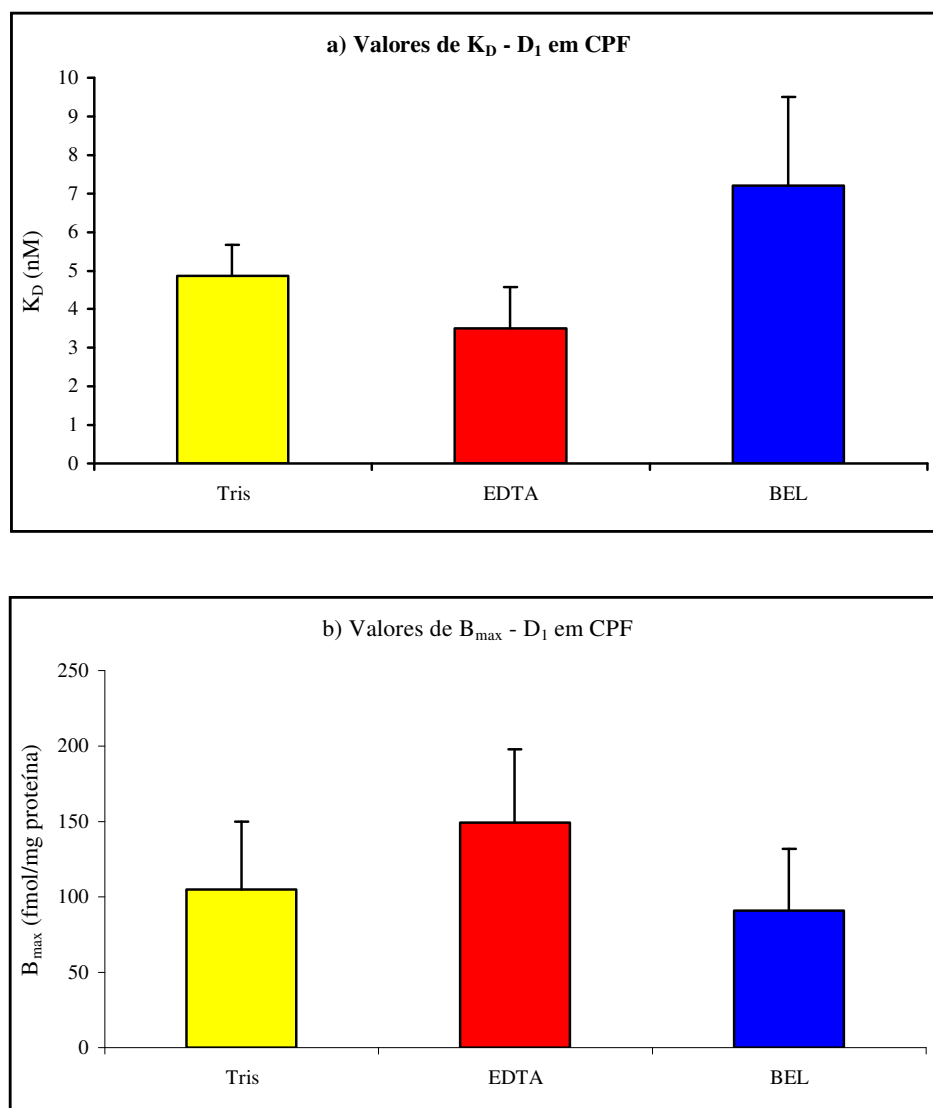


Figura 30: Efeitos da atividade da PLA₂GVI nos receptores D₁ em CPF. (a) Ao aumentar a atividade da PLA₂GVI (com EDTA), a afinidade de D₁ à ³H-SCH 23390 aumentou ($K_D = 3,5 \pm 1,07$ vs $4,8 \pm 0,81$ nM, $p = 0,005$) e, ao inibir a PLA₂GVI (com BEL), a afinidade de D₁ à ³H-SCH 23390 diminuiu ($K_D = 7,2 \pm 2,3$ vs $4,8 \pm 0,81$ nM, $p = 0,007$); (b) Densidade de receptores D₁ aumentou ao induzir aumento na atividade da PLA₂GVI ($B_{max} = 149 \pm 49$ vs 105 ± 45 fmol/mg proteína, $p = 0,05$), e sofreu leve diminuição ao inibir a PLA₂GVI ($B_{max} = 91 \pm 41$ vs 105 ± 45 fmol/mg proteína, $p = 0,47$), $n = 10$.

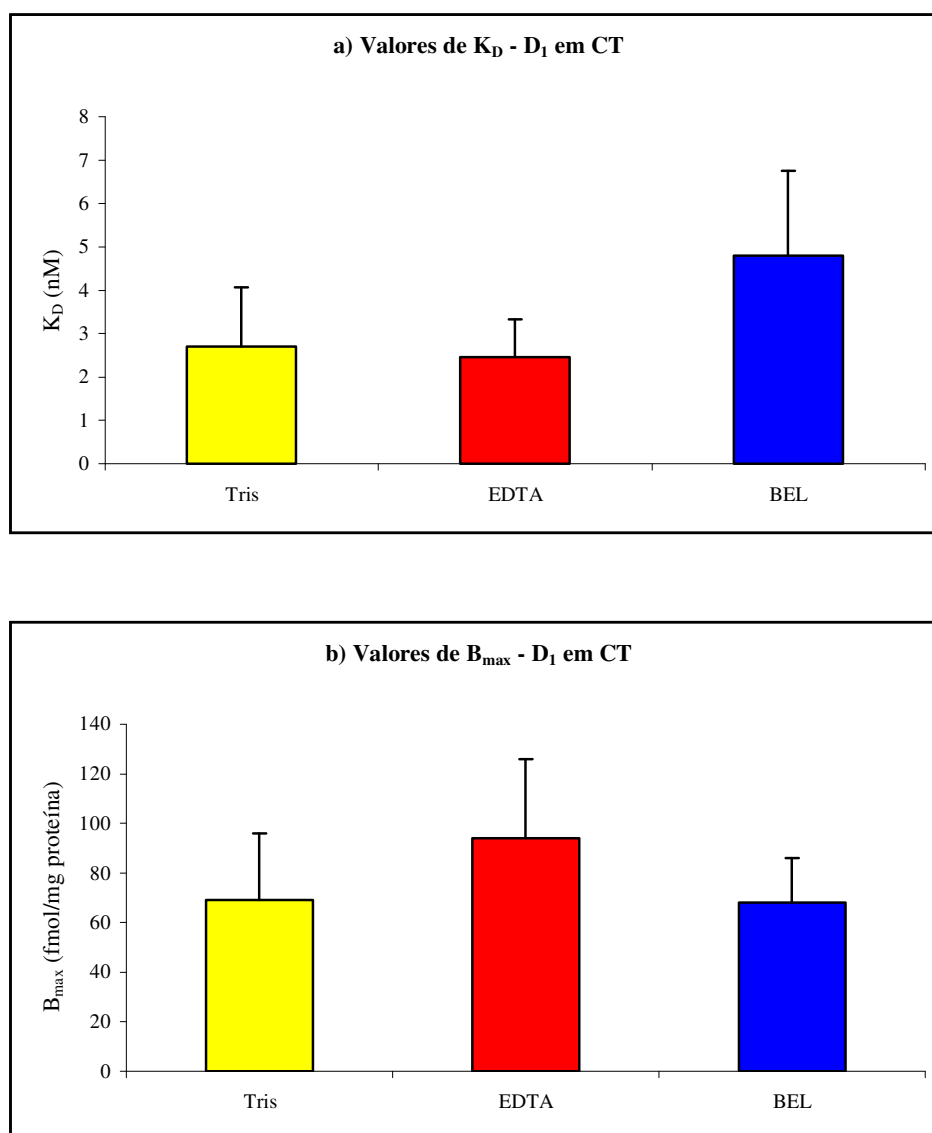


Figura 31: Efeitos da atividade da PLA₂GVI nos receptores D₁ em CT. (a) Ao aumentar a atividade da PLA₂GVI (com EDTA), a afinidade de D₁ à ³H-SCH 23390 não foi alterada e, ao inibir a PLA₂GVI (com BEL), a afinidade de D₁ à ³H-SCH 23390 diminuiu ($K_D = 4,79 \pm 1,96$ vs $2,7 \pm 1,36$ nM, $p = 0,02$ - CT); (b) Densidade de receptores D₁ aumentou ao induzir aumento na atividade da PLA₂GVI ($B_{max} = 94 \pm 32$ vs 69 ± 27 fmol/mg proteína, $p = 0,08$) e não sofreu alteração ao inibir a PLA₂GVI, $n = 10$.

Para receptores D_2 , ao induzir um aumento na atividade da PLA_2GVI , houve um aumento no valor de K_D em estriado para receptores D_2 , indicando uma queda (45 %) na afinidade desses receptores à droga radioativa empregada (3H -Sulpirida) ($K_D = 16,2 \pm 5,07$ vs $9,04 \pm 2,99$ nM, $p = 0,02$). Ao inibir a enzima, não houve alteração significativa no valor de K_D ($K_D = 8,78 \pm 2,57$ vs $9,04 \pm 2,99$ nM, $p = 0,84$) e, conseqüentemente, na afinidade de D_2 à 3H -Sulpirida (Figura 32a). Com relação à densidade dos receptores D_2 (B_{max}), a mesma foi aumentada (27 %) ao induzir um aumento na atividade da PLA_2GVI ($B_{max} = 216 \pm 82$ vs 157 ± 42 fmol/mg proteína, $p = 0,08$), porém, não sofreu alteração ao inibi-la ($B_{max} = 151 \pm 32$ vs 157 ± 42 fmol/mg proteína, $p = 0,74$) (Figura 32b).

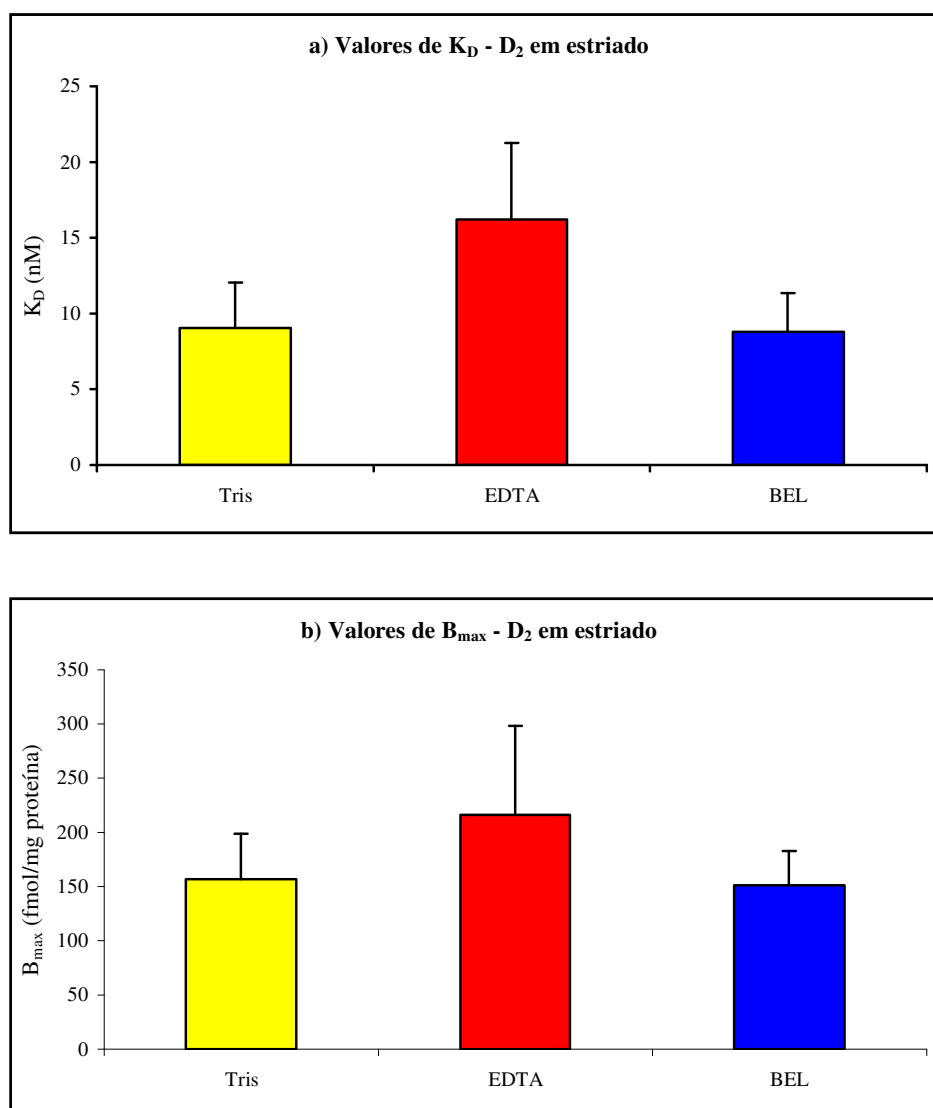


Figura 32: Efeitos da atividade da PLA₂GVI nos receptores D₂ em estriado. (a) Ao aumentar a atividade da PLA₂GVI (com EDTA), a afinidade de D₂ à ³H-Sulpirida diminuiu ($K_D = 16,2 \pm 5,07$ vs $9,04 \pm 2,99$ nM, $p = 0,02$) e, ao inibir a PLA₂GVI (com BEL), a afinidade de D₂ à ³H-Sulpirida não foi alterada; (b) Densidade de receptores D₂ aumentou ao aumentar a PLA₂GVI ($B_{max} = 216 \pm 82$ vs 157 ± 42 fmol/mg proteína, $p = 0,08$), e não sofreu alteração ao inibir a PLA₂GVI; $n = 10$.

Nas tabelas 13 e 14 há um resumo dos resultados acerca da afinidade e da densidade, respectivamente, dos receptores dopaminérgicos D₁ e D₂.

Tabela 13: Efeitos da PLA₂GVI na afinidade de ligação aos receptores D₁ e D₂.

Afinidade de ligação	Receptor D ₁	Receptor D ₂
EDTA	↑ (exceto em CT)	↓
BEL	↓	↑

Tabela 14: Efeitos da PLA₂GVI na densidade dos receptores D₁ e D₂.

Densidade de receptores	Receptor D ₁	Receptor D ₂
EDTA	↑	↑
BEL	—	—

6 DISCUSSÃO

O estudo em cérebros de indivíduos neurologicamente saudáveis visou simular as alterações da PLA₂ encontradas na esquizofrenia, e investigar as repercussões que teriam nos receptores dopaminérgicos D₁ e D₂ antes e após estimulação e inibição da PLA₂. O número de amostras (10), bem como o período *post mortem* (10 – 24 h) foram baseados em estudos já descritos na literatura e que, inclusive, são estudos sobre a PLA₂ (Tang et al., 1997; Ross et al., 1995, 1998a e b, e 1999). Em um desses estudos (Ross et al., 1995) foi feito um teste para verificar a estabilidade da PLA₂ em tecido cerebral *post mortem*. Este teste foi feito com amostras de tecido *post mortem* e de biópsia, tanto de humanos quanto de ratos, e foi verificado que a liberação de ácidos graxos, através da ação catalítica da PLA₂ sobre os fosfolípidos, foi similar tanto em tecido *post mortem* como em tecido proveniente de biópsia, indicando estabilidade da enzima após a morte.

Nesse trabalho, optamos por estudar os córtices pré-frontal e temporal, e estriado, por se tratar de áreas em que vêm sendo relatadas alterações na esquizofrenia. Alguns exemplos são: alteração na expressão emocional, no planejamento e na produção de novas idéias, as quais estão diretamente relacionadas ao CPF (Abi-Dargham et al., 2002; Barch et al., 2003); hiperatividade DA estriatal (Seeman, 1987; Abi-Dargham et al., 1998) e SEP causados por antipsicóticos, os quais estão diretamente ligados à função

estriatal (Farde et al., 1992; Wong e Van Tol, 2003); alterações no volume do CT (Dauphinais et al., 1990; Flaum et al., 1995); aumento nos níveis de PDE no lobo temporal (Pettegrew et al., 1991; Stanley et al., 1995; Fukuzako et al., 1999), e sintomas como halucinações auditivas, relacionados a hiperatividade dopaminérgica no lobo temporal (Ropohl et al., 2004; Gaser et al., 2004).

Antes de verificar os efeitos da PLA₂ sobre os receptores DAs e sobre a fluidez de membranas, parte considerável deste trabalho teve que se dedicar à padronização dos ensaios de receptores DAs D₁ e D₂ em tecido cortical e estriatal; alguns estudos para obter as melhores condições para a determinação da atividade da PLA₂, além de identificar o grupo predominante dessa enzima nas regiões cerebrais alvos deste estudo; e experimentos de padronização para observar os efeitos sobre a fluidez de membranas ao induzir um aumento ou ao inibir a PLA₂.

6.1 Padronização dos ensaios de receptores dopaminérgicos

O método utilizado para a dosagem de receptores foi o de preparações de tecido cerebral com posterior filtração para separar o complexo RL* formado. As principais vantagens desse método são: (1) é um método simples, sensível, altamente reprodutível e rápido; (2) as propriedades de moléculas de receptores, de transportadores e de drogas de interesse farmacológico podem ser estudadas; (3) a investigação de diferentes receptores pode ser feita em diversos sistemas (tecidos, células sanguíneas, plasma, sinaptossomas, etc) (Atweh e Kuhar, 1977; Zoli et al., 1993; Fior e Fuxe, 1995). Entretanto, necessita de maior quantidade de amostra e, conseqüentemente, de

receptores do que o método de radioautografia, no qual uma fina fatia de tecido já é suficiente. Porém, a radioautografia dispensa um tempo bem maior (de 3 até 15 semanas) para obter os resultados; um grande cuidado para que as lâminas não sejam contaminadas, além da necessidade de uma série de materiais apropriados, como criostato, filme sensível à radioatividade, revelador apropriado, vídeo câmera para adquirir a imagem do filme radioautográfico, e sala própria para revelação dos filmes (Köhler e Radesäter, 1986; De Keyser et al., 1988; Fior, 1999; Myers et al., 2001).

Os primeiros ensaios de ligação de receptores foram realizados nos córtices frontal e temporal. Como nestas regiões há a presença de altas concentrações de receptores 5-HT_{2A} (Pazos et al., 1987), além dos receptores D₁ e D₂, e os radioligantes utilizados também possuem alta afinidade aos receptores 5-HT_{2A} (Pedigo et al., 1981), foi necessário o uso de um antagonista específico para esses últimos, ketanserina. Dessa forma, foram realizadas curvas de competição para determinar qual a melhor dose de ketanserina a ser utilizada nos ensaios em regiões corticais (Figura 8). Todavia, ao iniciar os estudos de inibição, foi observado que o uso de altas concentrações de ketanserina levou também ao bloqueio dos receptores DAs e, portanto, foi necessário encontrar a concentração de ketanserina capaz de inibir completamente os receptores 5-HT_{2A}, mas sem interferir na determinação da ligação aos receptores D₁ e D₂. As concentrações encontradas para o bloqueio total dos receptores 5-HT_{2A} foram de 70 nM para o ensaio com receptores D₁ e de 60 nM para o ensaio com os receptores D₂. Para padronizar os experimentos de concentração de proteína e de saturação, foi utilizada a concentração de 100 nM de ketanserina. Em tecido estriatal, embora praticamente não

haja receptores 5-HT_{2A}, além de ser a região onde a densidade de receptores D₁ e D₂ é bem maior que em qualquer outra região cerebral humana (Hall et al., 2000), também foram feitos ensaios para verificar se realmente não haveria a necessidade do uso de ketanserina, o que de fato foi constatado.

Definida a concentração de ketanserina (para tecido cortical), o próximo passo foi definir a melhor concentração de proteína para os ensaios de saturação, em que se calculam os parâmetros B_{max} (densidade máxima de receptores) e K_D (constante de dissociação). É importante definir a melhor concentração de proteína para cada região estudada devido às diferentes concentrações de receptores presentes em cada área.

A ligação de um radioligante específico a seu receptor não depende apenas do tipo de tecido utilizado, mas também da concentração de receptores (proteínas) no ensaio. Assim, é necessário estimar a concentração de proteína que contenha a quantidade ótima de moléculas de receptores em dependência da concentração de radioligante utilizado, a fim de obter resultados melhores e altamente reprodutíveis. Nestes ensaios também é importante obter uma boa razão entre a ligação específica e a ligação inespecífica (alta ligação específica e baixa ligação inespecífica) para garantir que os próximos experimentos tenham boa reprodutibilidade e também uma quantidade de proteína suficiente para realizar uma curva de saturação com as diferentes concentrações de radioligante (Fior e Fuxe, 1995). Assim, para os experimentos de saturação em tecido cortical foi usada a concentração de 10 mg de peso bruto de proteína /mL de tampão de incubação para os receptores D₁ e de 12 mg/mL para os receptores D₂ (Figura 9). Nessas concentrações começou a haver maior separação entre

as curvas referentes à ligação específica e à inespecífica. Em tecido estriatal, a ligação de $^3\text{H-SCH 23390}$ aos receptores D_1 em estriado foi bem melhor que em áreas corticais e, assim, uma concentração de proteína de apenas 5,0 mg/mL já foi suficiente para obter alta ligação específica e baixa ligação inespecífica (Figura 11).

Para os receptores D_2 , foram utilizados dois radioligantes para verificar qual seria o melhor para os experimentos de saturação, $^3\text{H-Sulpirida}$ e $^3\text{H-Espiperona}$. Como $^3\text{H-Sulpirida}$ é, segundo dados da literatura (Hall e Wedel, 1986), mais específico para receptores D_2 , esperava-se obter uma curva melhor com o uso desse radioligante, entretanto, a melhor curva foi com o uso de $^3\text{H-Espiperona}$ (Figura 12). Dessa forma, ao usar $^3\text{H-Sulpirida}$, a melhor concentração de proteína foi de 12 mg/mL e, ao usar $^3\text{H-Espiperona}$, essa concentração caiu para 6,0 mg/mL, ou seja, a metade, o que é muito importante, já que permitiria utilizar uma quantidade de tecido bem menor quando o radioligante fosse $^3\text{H-Espiperona}$.

O experimento de saturação é o alicerce dos estudos de ligação, já que o mesmo é necessário para estimar os parâmetros denominados B_{max} : densidade máxima de receptores que se ligam especificamente ao radioligante (também representa o número de receptores por unidade de tecido) e K_D : constante de equilíbrio de dissociação, que descreve a afinidade do radioligante ao receptor específico. Quanto maior o valor de K_D menor será a afinidade de ligação aos receptores. Além disso, K_D fornece o valor de concentração de radioligante necessário para ligar-se a 50 % dos receptores (Kerwin e Pilowsky, 1995).

Há duas importantes razões para estimar a afinidade de um radioligante a seu receptor: (1) para ter um parâmetro seguro em experimentos de curvas de competição, onde a determinação de valores de IC_{50} , por exemplo, para antagonistas de receptores DAs, deve ser realizada com concentrações de radioligante próximas ao valor de K_D . Apenas assim é possível obter resultados na região de uma correlação linear entre a ligação específica do ligante ao receptor e a concentração do radioligante. Além disso, o uso de concentrações próximas ao valor de K_D possibilita uma comparação direta a valores de IC_{50} de diferentes estudos já realizados; (2) com esses experimentos pode-se observar alterações em K_D que já foram relatados para diferentes doenças neuropsicológicas e/ ou após o tratamento com neurolépticos ou antidepressivos (Molinoff, 1999). Destes resultados pode-se concluir se uma droga específica altera as propriedades de um receptor ou se receptores específicos estão envolvidos na patofisiologia de desordens psiquiátricas. Isto pode ser observado através da comparação entre indivíduos saudáveis e indivíduos com alguma desordem, ou mesmo entre indivíduos com desordens antes e após tratamento medicamentoso. No presente estudo foram avaliadas as propriedades dos receptores DAs D_1 e D_2 ao induzir um aumento ou ao inibir a atividade da PLA_2 , comparando com os resultados observados na condição controle (basal). Esses resultados estão discutidos mais adiante, já que, primeiramente, houve a necessidade de padronizar os ensaios de saturação para os receptores D_1 e D_2 nas regiões aqui investigadas.

A constante de dissociação encontrada em CPF, $K_D = 1,5$ nM e a densidade de receptores, $B_{max} = 23$ fmol/mg proteína (Figura 13), estão de acordo com valores já relatados na literatura. De Keyser e colaboradores (1988) encontraram $K_D = 1,5$ nM e

$B_{\max} = 45$ fmol/mg proteína em CPF. Em CT, analisando-se os dados para os receptores D_1 , foram encontrados valores de K_D e B_{\max} semelhantes aos encontrados em CPF, $K_D = 1,6$ nM e $B_{\max} = 26$ fmol/mg proteína (Figura 14). O valor de B_{\max} encontrado no gráfico foi corrigido de acordo com a quantidade de proteína da amostra utilizada no experimento, para um valor de fmoles finais correspondente a 1,0 mg de proteína. É importante dizer que o valor de B_{\max} pode variar de um estudo para outro, pois depende da quantidade de proteína utilizada. Assim, é um parâmetro de comparação de grande importância quando são utilizadas as mesmas condições experimentais, conforme foi feito neste estudo.

Para os receptores D_2 não foi possível obter curvas de saturação pelo método empregado nos experimentos deste trabalho, provavelmente devido ao fato de haver uma densidade muito baixa destes receptores em área cortical. Na literatura (De Keyser et al., 1988) há dados de valores de $K_D = 0,1$ nM para receptores D_2 em tecido cortical, porém com o uso de radioautografia, em que é necessária apenas uma fina fatia de tecido para realizar a ligação aos receptores alvo.

Em tecido estriatal, para o receptor D_1 foi obtido um valor de $K_D = 1,1$ nM (Figura 16), o qual está de acordo com os valores descritos na literatura: $K_D = 0,87 \pm 0,03$ nM (núcleo caudado) e $0,78 \pm 0,03$ nM (putamen) (Bowden et al., 1997). Nos experimentos com os receptores D_2 , assim como na dosagem de proteínas, foram utilizados dois diferentes radioligantes, ^3H -Sulpirida e ^3H -Espiperona, também para verificar qual o melhor a ser utilizado. Conforme diferentes estudos, o valor de K_D para o uso de ^3H -Sulpirida em estriado de rato é, em média, de aproximadamente 5,5 nM (3,3 – 15,6 nM) (Hall e Wedel, 1986) e em estriado de cachorro está entre 10,8 e 15,9 nM

(Templeton e Woodruff, 1983). O valor encontrado nos experimentos deste estudo foi $K_D = 7,2$ nM (Figura 17).

Ao contrário do que ocorreu nos ensaios de concentração de proteína em que se utilizou ^3H -Espiperona como radioligante, os ensaios de saturação (total de 6) não apresentaram boas curvas (Figura 18a). Foram verificadas concentrações maiores de radioligante, diferentes tempos e temperaturas de incubação, tampões e concentrações de proteína. Entretanto, apenas na condição em que foi utilizado um outro tampão, composto por três sais (MgCl_2 , CaCl_2 e KCl) a mais do que se costumava utilizar (Tris e NaCl) e temperatura de incubação de 37°C , foi possível obter uma boa curva de saturação (Figura 18b), com valor de $K_D = 2,0$ nM. Porém, ao tentar replicar esse resultado, observou-se diferentes valores de K_D , que variavam de 3,8 até 20,7 nM (4 experimentos), o que é considerada uma variação muito alta para ensaios de receptores e também para o uso do radioligante ^3H -Espiperona. Dessa forma, foi usada apenas ^3H -Sulpirida para os ensaios de receptores D_2 em estriado. Todos os testes com ^3H -Espiperona foram realizados porque este radioligante costuma ligar-se melhor a receptores D_2 comparado a ^3H -Sulpirida, e também porque sua aquisição é de mais fácil acesso.

6.2 Otimização da atividade da fosfolipase A_2

Os ensaios de otimização da atividade da PLA_2 , primeiramente, foram realizados em tecido cerebral humano *post mortem* (CPF) a fim de verificar quais seriam as condições ótimas para a PLA_2 desenvolver sua atividade máxima.

A PLA₂ apresentou melhor atividade no intervalo de tempo de incubação entre 15 e 45 min, tendo uma queda bem acentuada na atividade em 5 min, e um pouco menos acentuada a partir de 45 min. Dessa forma, foi utilizado tempo de incubação de 30 min, por ser este um tempo intermediário dentro do melhor intervalo de tempo observado para a atividade da enzima. Utilizando este tempo de incubação, foi verificada qual seria a melhor concentração de Ca²⁺, já que ainda não era conhecido o grupo de PLA₂ predominante em tecido cerebral humano. Todavia, aparentemente não houve uma concentração ótima de Ca²⁺ para a atividade da PLA₂, ocorrendo apenas um leve aumento de atividade nas concentrações de 10 µM e de 1,0 mM. A princípio, esse resultado poderia ser explicado porque, segundo a literatura, os diferentes grupos de PLA₂ requerem diferentes concentrações de Ca²⁺ para desempenharem suas atividades: PLA₂GIV - requer concentrações de Ca²⁺ < micromolares, PLA₂ secretada (PLA₂GIB, PLA₂GII, PLA₂GIII, PLA₂GV, PLA₂GX, PLA₂GXII e PLA₂GXIII) - requer concentrações de Ca²⁺ milimolares (Leslie, 1997; Yang et al., 1999; Hirabayashi e Shimizu, 2000), e PLA₂GVI - a atividade é independente de Ca²⁺ (Jenkins et al., 2001). Assim, não é possível dizer qual a melhor concentração para obter atividade máxima da PLA₂, provavelmente devido à presença de diferentes grupos dessa enzima em atividade sob as condições utilizadas.

Dessa forma, a etapa seguinte foi identificar e isolar o grupo predominante de PLA₂. Para isso, foi necessário utilizar um inibidor seletivo para os diferentes grupos de PLA₂.

Antes de dar seqüência à discussão dos resultados provenientes dos estudos de inibição, faz-se necessário um breve resumo acerca dos inibidores de PLA₂: os inibidores mais conhecidos e utilizados para as fosfolipases A₂ são: AACOCF₃ (araquidonil trifluormetil cetona), PACOCF₃ (palmitoil trifluormetil cetona), MAFFP (metil araquidonil fluorofosfonato) e BEL (Figura 33) Todavia, o MAFFP, o PACOCF₃ e o AACOCF₃ são inibidores duais da PLA₂GIV e da PLA₂GVI (Lio Y-C et al., 1996; Farooqui et al., 1999), enquanto que o BEL inibe a PLA₂GVI com preferência de 1000 vezes em relação à PLA₂ secretada, e é um inibidor muito fraco da PLA₂GIV (Hazen et al., 1991; Balsinde e Dennis, 1996).

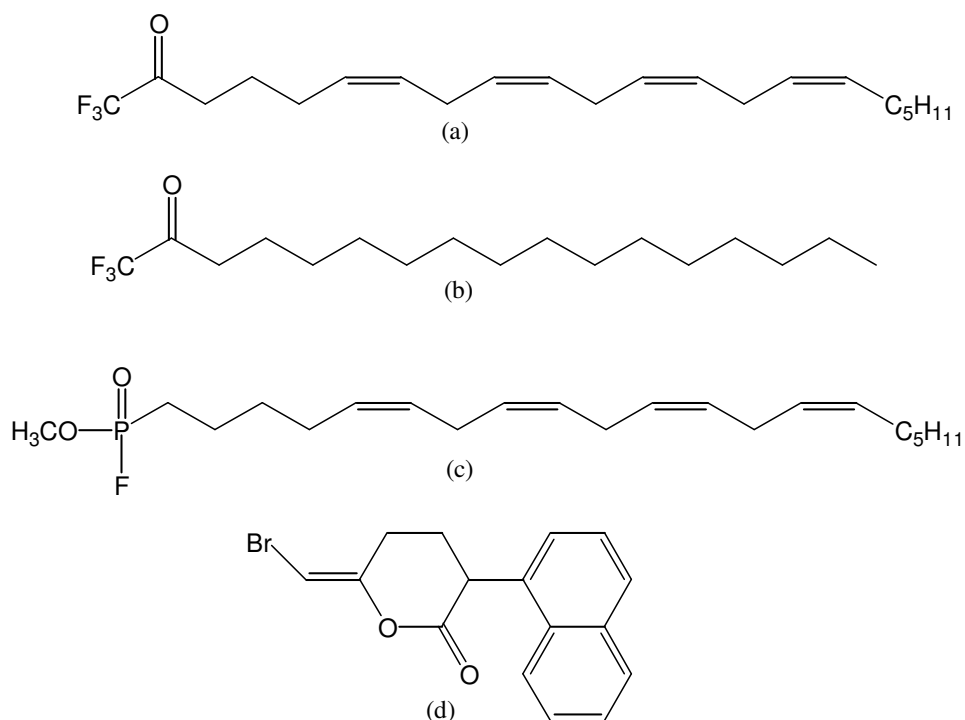


Figura 33: Inibidores de PLA₂. (a) AACOCF₃, (b) PACOCF₃, (c) MAFFP, (d) BEL.

AACOCF₃: esse inibidor pode penetrar facilmente na membrana celular devido a suas propriedades físico-químicas. É cerca de 500 vezes mais potente para PLA₂GIV do que para PLA₂ secretada, e também pode inibir a PLA₂GVI, já que esta também possui um resíduo Ser no seu sítio ativo. Estudos de RMN propõem que a cadeia carbônica desse inibidor liga-se em uma bolsa hidrofóbica e que o grupo carbonila do AACOCF₃ forma uma ligação covalente com o sítio ativo Ser 228 gerando um oxianion hemicetal carregado, que interage com um grupo carregado positivamente de outra molécula de enzima, inativando-a (Farooqui et al., 1999). Sua ação é bem lenta, porém é um inibidor bastante potente e, desde que interaja com a PLA₂ durante um tempo considerável (cerca de 30 min), uma baixa concentração já é suficiente para sua ação inibitória (Riendeau et al., 1994). Sob diluição este inibidor se dissocia rapidamente da PLA₂GVI, e bem lentamente da PLA₂GIV (Farooqui et al., 1999).

PACOCF₃: é 4 vezes mais potente que o AACOCF₃, porém de forma contrária a esse, apresenta uma rápida velocidade de dissociação e, sob diluição, toda a atividade da PLA₂ pode ser recuperada, indicando uma inibição reversível (Farooqui et al., 1999).

MAFP: é um fosfonato análogo ao AA, e é um inibidor irreversível. Inibe tanto a PLA₂GIV como a PLA₂GVI, possuindo seletividade, e provavelmente mecanismo de ação, semelhante para ambos os grupos de PLA₂, e não tem nenhum efeito sobre PLA₂ secretada. Esse inibidor atua sobre o resíduo Ser no seu sítio ativo através de uma reação de fosforilação, impedindo assim, sua recuperação, o que o torna irreversível (Farooqui et al., 1999).

BEL: é um inibidor seletivo de PLA₂GVI e é 1000 vezes mais potente para PLA₂GVI em relação à PLA₂ secretada, sendo um inibidor muito fraco de PLA₂GIV

(Farooqui et al., 1999). Também é um inibidor irreversível, porém seu mecanismo de ação é diferente ao do MAFP, já que, ao contrário desse, não se liga diretamente ao sítio ativo da enzima. Primeiramente, devido a sua natureza apolar, cruza rapidamente as membranas celulares, instalando-se próximo ao sítio ativo da PLA₂GVI, onde sofre uma hidrólise e gera uma cetona super reativa, a α -bromometil cetona (Figura 34). Essa cetona é gerada em uma conformação apropriada no sítio ativo da enzima, inibindo-a. Se gerada fora do sítio ativo, essa espécie reativa fica impossibilitada de alcançar o mesmo e, conseqüentemente, de inibir a PLA₂GVI. Essas conclusões foram obtidas através de um estudo feito em miocárdio canino (Hazen et al., 1991).

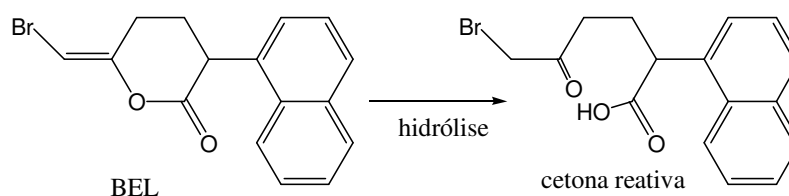


Figura 34: Cetona reativa para ação inibitória da PLA₂GVI. Gerada através de uma hidrólise do BEL.

Tendo em vista tais inibidores, foram construídas curvas de inibição da atividade da PLA₂GVI utilizando BEL como inibidor, para verificar a proporção desse grupo de PLA₂, bem como da PLA₂GIV, em tecido cerebral humano. Todavia, por questões metodológicas, os ensaios preliminares foram feitos com tecido cerebral de ratos “Wistar” machos, onde a primeira região estudada foi o hipocampo, pois já havia outro projeto em andamento, sendo que um dos enfoques pretendia averiguar o grupo predominante de PLA₂ envolvido no processamento da memória do rato (Schaeffer e

Gattaz, 2005). Sendo assim, esses resultados poderiam ser utilizados como base para realizar os estudos em tecido cerebral *post mortem* de humanos (CPF, CT e estriado), para evitar perdas de amostras de tecido cerebral humano, e também porque em tecido cerebral de rato a leitura referente à atividade da PLA₂ costuma ser maior (chegando a 6,0 pmol.mg/min), o que permite melhor visualização e comparação dos resultados. Em humanos, a atividade da PLA₂ não passou de 0,9 pmol.mg/min.

Assim, foram construídas curvas de inibição com BEL em tecido cerebral de rato (Figura 21), uma com o uso de Ca²⁺ 5,0 mM e outra com EDTA 5,0 mM (para certificar de que não era apenas a PLA₂GVI que estava presente nesses estudos). Ambas as curvas apresentaram o mesmo padrão de inibição, que foi praticamente de 100 %. Entretanto, ao usar Ca²⁺ 1,0 μM, restou 9,0 % de atividade, podendo ser de PLA₂GIV e/ ou PLA₂ secretada. Também era esperado obter atividade menor da PLA₂ para o ensaio com EDTA (Tabela 8), já que, a princípio, na ausência de Ca²⁺ estaria havendo atividade apenas da PLA₂GVI. Todavia, ocorreu exatamente o contrário, a atividade da PLA₂ foi maior nesta condição.

Há alguns estudos em miocárdio canino, onde a atividade de um subtipo de PLA₂GVI, a PLA₂GVIA-2, era inibida ao adicionar Ca²⁺ (Wolf e Gross, 1985). Porém, é conhecido que o grupo PLA₂GVI não requer Ca²⁺ como um cofator obrigatório em catálise, nem emprega Ca²⁺ para associar-se à membrana, ou seja, o íon Ca²⁺ não regula diretamente a atividade desta enzima. Em outras investigações, também em miocárdio (desta vez de coelho) foi descoberto que a inibição desse subtipo de PLA₂GVI proveniente da adição de Ca²⁺ estava associada a um “fator de proteína”, que foi

identificado como calmodulina (CaM), a qual é responsável por modular a atividade da PLA₂G_{VIA}-2 (Wolf e Gross, 1996). Através de uma análise mais detalhada da interação da PLA₂G_{VIA}-2 com CaM, foi demonstrada a formação de um complexo ternário cataliticamente inativo, CaM.Ca²⁺.iPLA₂, que poderia ser reversivelmente dissociado após a quelação de todo Ca²⁺ com EGTA, fazendo com que a PLA₂G_{VIA}-2 voltasse a ter sua atividade catalítica total (Wolf et al., 1997; Jenkins et al., 2001). Esse complexo é formado devido à mudança na conformação da CaM induzida pelo Ca²⁺ e, ao associar-se à CaM nessas condições, a PLA₂G_{VIA}-2 também sofre uma alteração conformacional próxima ao seu sítio ativo, inviabilizando assim, sua atividade catalítica (Jenkins et al., 2001). De acordo com estes dados pode-se dizer que a alta atividade encontrada ao utilizar EDTA pode estar relacionada à PLA₂G_{VIA}-2 complexada à CaM na presença de íons Ca²⁺. Como nos experimentos com EDTA a atividade da PLA₂ foi superior àquela em que se utiliza Ca²⁺ e, ao utilizar uma concentração de BEL de 100 µM houve inibição total da atividade da PLA₂, pode-se supor que praticamente não há PLA₂ secretada ou PLA₂G_{IV} em tecido hipocampal de rato e, dessa forma, a curva de inibição com BEL apresenta apenas um sítio de ligação, referente à inibição da PLA₂G_{VI}.

Após os experimentos preliminares de inibição da PLA₂G_{VI} em ratos, os mesmos foram realizados em tecido cerebral humano. Para isso, tomou-se como base as concentrações de BEL utilizadas nos experimentos em cérebro de rato (total de 14 pontos, variando de 100 nM –500 µM). A concentração de Ca²⁺ utilizada foi de 10 µM porque é uma condição desfavorável à PLA₂ secretada (atividade favorecida em concentrações de Ca²⁺ milimolares). Também foi construída uma curva com EDTA 1,0

mM no lugar do Ca^{2+} para confirmar o resultado encontrado em rato (Tabela 8), bem como para verificar se a inibição seria semelhante nestas duas condições (Figura 26).

Foi possível observar um patamar de inibição entre 300 e 500 μM , ou seja, com BEL 300 μM já houve inibição total da PLA_2GVI , 90 % com Ca^{2+} e 85 % com EDTA. A atividade restante possivelmente foi de PLA_2GIV , já que as condições utilizadas acerca da concentração de Ca^{2+} desfavorecem a atividade do grupo PLA_2 secretada, embora ainda possa estar havendo uma pequena participação desse grupo. Assim como em tecido cerebral de rato, pôde ser verificado que a atividade da PLA_2 aumentou com o uso de EDTA (Tabela 9), sendo este aumento menos acentuado a partir da concentração de BEL de 200 μM , pois a partir desse valor praticamente já não há atividade de nenhuma PLA_2GVI .

Após determinar o melhor tempo de incubação para a atividade da PLA_2 , e também após os estudos de inibição da PLA_2GVI , foram realizados outros experimentos a fim de otimizar a atividade da PLA_2 em tecido cerebral *post mortem* de humanos (CPF, CT e estriado). Nesses ensaios foram utilizados homogeneizados apenas da substância cinzenta, sendo todos realizados com amostras de três indivíduos. Primeiramente, foram construídas curvas de atividade da PLA_2 em função da concentração de substrato (PC^{14}C) e de proteína, que são fatores importantes para a otimização da PLA_2 , a qual é diretamente dependente desses parâmetros.

A curva referente à concentração de substrato revelou um aumento bem acentuado na atividade da PLA_2 ao utilizar uma concentração de PC^{14}C de 0,075

$\mu\text{Ci/mL}$ (aumento de aproximadamente 30 % em relação à concentração de 0,06 $\mu\text{Ci/mL}$). Utilizando este valor de concentração de substrato, realizou-se a determinação da melhor concentração de proteína para a atividade da PLA_2 . As concentrações de proteína de 1,5 e de 1,75 mg/mL mostraram um aumento na atividade da PLA_2 considerável em comparação às concentrações menores (cerca de 10 % maior). A concentração de proteína utilizada passou a ser de 1,5 mg/mL, para permitir o uso de menor quantidade de amostra.

Outro parâmetro testado foi o pH, que também é um fator importante para atividade da PLA_2 , já que os diferentes grupos dessa enzima possuem suas atividades favorecidas por um determinado valor de pH. A melhor atividade da PLA_2 foi alcançada ao utilizar pH 7,5 e um pouco menor com pH 8,0. Isto pôde ser notado nas três regiões estudadas (CT, CPF e estriado). Além disso, a atividade da PLA_2 sofreu uma queda considerável em pH 8,5 nas três regiões (50 % em CT, 60 % em CPF e 80 % em estriado). De acordo com dados da literatura (Ross et al., 1999; Yang et al., 1999; Winstead et al., 2000), o pH 7,5 é o ideal para o desempenho da atividade da PLA_2GVI e pH 8,5 para o desempenho da atividade da PLA_2GIV . Esse resultado confirma os estudos de inibição, indicando um predomínio da atividade da PLA_2GVI (cerca de 85 %) nas regiões estudadas. Também foi construída outra curva de concentração de Ca^{2+} para averiguar se, mesmo após definir outros parâmetros, continuaria a haver linearidade nos resultados, o que foi constatado. Porém, houve queda na atividade em concentrações milimolares e um ligeiro aumento conforme as concentrações de Ca^{2+} diminuía, sendo que a atividade máxima da PLA_2 foi com o uso de EDTA.

Além dos resultados obtidos ao usar EDTA, BEL, e o fato de o melhor pH ser o de 7,5, também foi observado que a atividade de PLA₂GIV nas regiões cerebrais estudadas é bem menor (em torno de 0,15 pmol.mg/min - cerca de 15 %) do que a atividade da PLA₂GVI (em torno de 3,0 pmol.mg/min - cerca de 85 %). Sendo assim, os estudos sobre os efeitos da PLA₂ nos receptores DAs foram realizados com as condições favoráveis à PLA₂GVI, podendo ser esta a enzima alterada em cérebro de esquizofrênicos. Dessa forma, para tais estudos foram utilizados BEL (100 µM) para inibir e EDTA para induzir um aumento na PLA₂GVI, já que com EDTA a atividade geral dessa enzima aumenta devido à liberação da PLA₂GVI-2 na ausência de íons Ca²⁺; e também porque até o momento não há ativadores seletivos de PLA₂GVI. Assim, foi necessário construir uma curva com diferentes concentrações de EDTA para certificar que não haveria mais Ca²⁺ para complexar com a CaM e, conseqüentemente com a PLA₂GVI, liberando essa enzima, e aumentando a atividade global da PLA₂. Também foi necessário o cuidado para que não houvesse excesso de EDTA, já que este pode se complexar a outros íons e causar alterações nas análises posteriores de comparação entre a atividade da PLA₂GVI e receptores DAs. A melhor concentração de EDTA para utilizar nos estudos acerca dos efeitos da PLA₂GVI sobre os receptores DAs e sobre a fluidez de membranas foi de 100 µM.

Um outro aspecto importante a relatar é que, antes dos experimentos de otimização, a atividade da PLA₂ em tecido cerebral humano era muito baixa (não passava de 0,9 pmol.mg/min). Após a otimização, a atividade da PLA₂ chegou, em média, a 3,0 pmol.mg/min, o que corresponde a um aumento na atividade em 70 %.

Nos estudos de estimulação e de inibição da PLA₂GVI, embora a diferença na atividade da PLA₂GVI ao ser estimulada, em relação à condição basal, não ter sido significativa ($p > 0,05$), houve um aumento percentual considerável na atividade (Figura 28), exceto em CT (15 % em estriado, 9,0 % em CPF e 5,0 % em CT). Entretanto, este aumento já foi suficiente para causar efeitos sobre os receptores DAs (discussão mais adiante). A diferença na atividade da PLA₂GVI ao ser inibida, em relação à condição basal, foi significativa ($p < 0,001$) em todas as regiões estudadas, com queda percentual bastante acentuada (88 % em CPF, 83 % em estriado e 72 % em CT).

6.3 Experimentos de fluidez de membrana

A respeito dos estudos de fluidez de membrana, reforçando a hipótese de que a atividade alterada da PLA₂ está correlacionada com o metabolismo anormal de fosfolípidos na esquizofrenia, estudos recentes em nosso laboratório (em andamento) têm apresentado indicações de um aumento na fluidez de membrana no CPF de pacientes esquizofrênicos, o que está diretamente associado a uma quebra acelerada de fosfolípidos. Por outro lado, um outro estudo também realizado em nosso laboratório (Schaeffer et al, 2005) apresentou uma diminuição na fluidez de membranas na presença de inibidores de PLA₂ (através de injeção intracerebral, *in vivo*, em hipocampo de ratos).

Entretanto, no presente estudo, em que a estimulação e inibição da PLA₂ foi feita *in vitro*, não houve diferenças significativas ($p > 0,05$) nos resultados ao compará-los com a condição controle, em que não houve interferência na atividade da PLA₂. Isso foi observado em preparados de homogenatos totais, de membranas totais e de membranas

sinaptossomais em um experimento piloto com o uso de três amostras de tecido cerebral referente às regiões de interesse nesse estudo (CPF, CT e estriado). O intervalo médio *post mortem* dessas amostras foi de 13,5 h (semelhante ao das amostras utilizadas no restante deste trabalho – 13 h, n = 10). Nesses ensaios, o resultado esperado era o de um valor de anisotropia menor com o uso de EDTA, o que indicaria um aumento na fluidez de membrana quando a atividade da PLA₂ fosse aumentada. Este fato seria causado por um aumento na quebra dos fosfolípidos de membrana por essa enzima (Pangerl et al., 1991; Yao et al., 2000). Já com o uso de BEL, o resultado esperado seria exatamente o oposto àquele com o uso de EDTA, ou seja, deveria haver aumento no valor da anisotropia, indicando uma diminuição na fluidez de membrana quando a atividade da PLA₂ fosse inibida, já que haveria quebra menor dos fosfolípidos de membrana, tornando assim, a membrana mais rígida (Eckert et al., 2000; Schaeffer et al., 2005).

Além de testar diferentes preparações de amostra, a estimulação e inibição da PLA₂ foram feitas antes do ensaio de anisotropia, e antes também da preparação de membranas, já que, ao prepará-las, principalmente as sinaptossomais, poderia haver perda de proteínas, inclusive de PLA₂, impedindo assim, de verificar se houve ou não alteração na fluidez de membrana ao induzir um aumento ou ao inibir esta enzima. Também foram feitos ensaios onde a estimulação e inibição da PLA₂ foram realizadas durante o experimento de anisotropia. Outro fator testado foi o tempo de incubação, tanto com a variação no tempo sendo feita durante a anisotropia, como anterior à mesma. Mesmo após todos esses testes, as únicas diferenças observadas foram com a preparação de membrana sinaptossomal inibindo a atividade da PLA₂ anterior ao experimento de anisotropia, nos tempos de 45 min e 1,5 h com o uso de BEL. Nestas

condições houve aumento nos valores de anisotropia e, conseqüentemente, queda na fluidez de membranas, conforme o esperado, porém essa diferença não foi significativa ($p > 0,05$). Além disso, para a mesma membrana, mas desta vez interferindo na atividade da PLA₂ e alterando o tempo de incubação durante a anisotropia, houve diferença nos valores com os tempos de 30 e 45 min, ocorrendo um aumento na fluidez de membranas com o uso de EDTA (resultado esperado), porém, com o uso de BEL também houve aumento na fluidez, quando o esperado era de que fosse diminuir. Novamente, tais diferenças não chegaram a ser significativas ($p > 0,05$). O fato de não observar diferenças significativas na fluidez de membranas ao induzir aumento ou ao inibir a PLA₂, provavelmente, é devido à ocorrência de todas as alterações possíveis na membrana durante o intervalo entre o óbito e a dissecação do tecido (*post mortem* 13,5 h). Já foram realizados estudos *in vitro*, *post mortem*, semelhantes a esse Porém, tais estudos foram feitos em ratos, sendo observadas diferenças na fluidez de membranas (Silva et al., 2002). Todavia, ao se trabalhar com ratos, ou algum outro animal, é possível retirar o tecido cerebral para realização do experimento logo após a morte, o que dificilmente é possível em humanos.

6.4 Efeitos da atividade da PLA₂GVI nos receptores dopaminérgicos

Tem sido encontrada atividade aumentada da PLA₂ tanto no sangue (Gattaz et al., 1990 e 1995b. Lasch et al., 2003; Smesny et al., 2005) como em tecido cerebral *post mortem* (Ross et al., 1999) de esquizofrênicos. Além disso, têm sido encontradas alterações em vários sistemas de neurotransmissão, sendo que há uma série de trabalhos, mais especificamente, acerca do sistema DA (Pilowsky et al., 1997; Abi-Dargham et al.,

1998 e 2000; Kapur e Seeman, 2001; Abi-Dargham e Laruelle, 2005). Há, ainda, trabalhos que encontraram relações entre a atividade da PLA₂ e o sistema DA (Myers et al., 2001; Ross et al., 2002; Lee et al., 2004 e 2005; Bhattacharjee et al., 2005).

A hipótese de desequilíbrio DA mesocórtico-límbico na esquizofrenia, proposta inicialmente por Weinberger (1987) e Robbins (1990), continua sendo aceita e descrita em trabalhos atuais (Abi-Dargham e Moore, 2003; Abi-Dargham, 2004), na tentativa, inclusive, de descrever uma possível causa para a hipofunção DA cortical, que leva a uma hiperatividade DA mesolímbica.

Frente a esses achados e hipóteses, o presente trabalho investigou os efeitos da atividade da PLA₂ nos receptores DAs. Foi encontrado aumento na afinidade dos receptores D₁ à ³H-SCH 23390 ao induzir aumento na atividade da PLA₂GVI com EDTA, indicando aumento na atividade DA em relação a esses receptores. Todavia, em CT não houve aumento (p = 0,66), podendo ser decorrente do fato de que há apenas um discreto aumento de 5,0 % na atividade da PLA₂GVI nessa região (Figura 28). Ao inibir a PLA₂GVI, houve diminuição na afinidade de D₁ à ³H-SCH 23390 em todas as regiões investigadas (Figuras 30a – 32a). Para os receptores D₂, foi observado exatamente o contrário do que foi visto para D₁. Houve diminuição (Figura 32a) na afinidade da ligação dos receptores D₂ à ³H-Sulpirida ao induzir um aumento na atividade da PLA₂GVI, indicando assim, que houve um prejuízo na atividade DA em relação aos receptores D₂. Ao inibir a enzima, não houve alteração na afinidade dos receptores D₂ à ³H-Sulpirida. Esses estudos foram observados apenas para tecido estriatal, já que não foi possível realizar curvas de saturação para D₂ em tecido cortical com o método aqui empregado.

Contudo, esses resultados parecem conflitar com os achados de hipoatividade DA cortical (Abi-Dargham e Moore, 2003) e hiperatividade DA mesolímbica (Dao-Castellana et al., 1997; Hirvonen et al., 2005). Todavia, alguns dados da literatura, acerca da PLA₂ e dos receptores DAs, corroboram os resultados encontrados neste trabalho: (1) a afinidade da ligação a D₂ foi reduzida em 82 % após 15 min de tratamento com PLA₂ em homogenato de núcleo caudado de ovelhas, ou seja, a PLA₂ prejudicou a ligação aos receptores D₂ (Oliveira et al., 1984), como encontrado no presente estudo; (2) a aplicação intracerebroventricular da PLA₂ antagonizou o aumento na locomoção induzido por apomorfina, sugerindo inibição da ligação aos receptores DAs pós-sinápticos pela PLA₂ (Gattaz e Brunner, 1996); (3) a inibição da atividade da PLA₂ usando BEL atenuou o efeito de fenoldopam (agonista de receptores D₁) em 74 %, em ratos, ou seja, ao inibir a PLA₂GVI houve uma diminuição na afinidade de ligação aos receptores D₁ (Grinder et al., 2003).

Em um estudo *post mortem*, foi descrito um aumento significativo ($p < 0,01$) na densidade de receptores D₁ em CT e em córtex parietal de sujeitos esquizofrênicos em relação a controles (Domyo et al., 2001), embora outros estudos *post mortem* não tenham encontrado alterações na densidade desses receptores (Laruelle et al., 1990; Knable et al., 1996). No presente estudo, o aumento na atividade da PLA₂GVI induziu um aumento na densidade de receptores D₁ em CT e CPF.

Entretanto, Lee e colaboradores (2004) encontraram, em homogenato de cérebro de rato (estriado), que a lisoPC (que resulta da atividade da PLA₂) diminuiu os valores de B_{max} (densidade) de ambos os receptores D₁ e D₂, mas não alterou os valores de K_D dos mesmos. Esses dados contrastam com os resultados obtidos neste trabalho, em que

os valores de K_D foram todos alterados, com exceção de D_1 em CT ao estimular a PLA_2GVI . Já os valores de B_{max} para os receptores D_1 e D_2 não sofreram alteração ao inibir a PLA_2GVI . Porém, os mesmos aumentaram, ou pelo menos, houve uma tendência a um aumento (D_1 em CPF – $p = 0,05$; D_1 em CT – $p = 0,08$; D_2 em estriado – $p = 0,08$), ao induzir aumento na PLA_2GVI , exceto para D_1 em estriado, onde não houve alteração (Figuras 30b – 33b).

Os presentes achados sugerem que uma elevação da PLA_2 em esquizofrenia, como descrito na literatura, poderia contribuir para a biologia da doença através de alterações na neurotransmissão dopaminérgica. Estas alterações foram complexas, afetando de forma heterogênea os receptores D_1 e D_2 nas diferentes áreas estudadas.

Em um estudo recente (Trantham-Davidson et al., 2004), feito com o uso de “patch-clamp”, em CPF de ratos (*in vitro*), foi observado que a concentração de dopamina é um determinante crítico na sinalização celular acerca de receptores D_1 e D_2 . Baixas concentrações de dopamina (< 500 nM) acionam a cascata de sinalização de D_1 , ao passo que, concentrações maiores (> 1,0 μM) acionam a cascata referente a D_2 . Quando ocorre o bloqueio de alguma etapa relacionada à via de receptores D_2 , há um aumento na sinalização conduzida por D_1 . Assim, quando os receptores D_2 ficam impedidos de realizar sua cascata de sinalização adequadamente, abrem caminho para a sinalização de D_1 , que têm sua afinidade de ligação aumentada pela ação da PLA_2 em estriado. Estes mecanismos poderiam estar envolvidos nas anormalidades da PLA_2 e dos receptores dopaminérgicos em esquizofrenia.

6.5 Limitações do estudo

- O método usado para o ensaio rádio-receptores (homogenato cerebral com separação por filtração), apesar de ser altamente reprodutível, rápido e de fácil execução, não é tão sensível quanto o método de radioautografia, onde uma fina fatia (20 – 100 μm de espessura) de tecido já é suficiente para observar diferenças na afinidade e na densidade de receptores. Com este método é possível verificar alterações até mesmo quando há baixa densidade de um receptor em uma determinada região cerebral, como no caso de D_2 em tecido cortical, o que não foi possível com o método usado neste trabalho;
- A presença de um ativador específico, ou ao menos seletivo, da atividade da PLA_2GVI proporcionaria uma análise comparativa ainda mais acurada entre a ação aumentada dessa enzima sobre os receptores D_1 e D_2 , já que o agente utilizado neste estudo, EDTA, causa um aumento indireto na atividade da PLA_2GVI por quelar o Ca^{2+} e favorecer, então, a atividade do subtipo $\text{PLA}_2\text{GVIA-2}$;
- O método usado para a determinação da atividade da PLA_2 , o rádio-enzimático, só é capaz de informar, separadamente, qual o grupo predominante de PLA_2 em uma determinada amostra, não sendo possível identificar quais subgrupos estão presentes. Essa identificação seria possível com o uso de uma combinação de outras técnicas. Por exemplo, neste estudo foi verificado que há um predomínio na atividade da PLA_2GVI em CPF, CT e estriado. Assim, poderia ser feita a

identificação dos subgrupos através de espectrometria de massa, que é um método bastante utilizado, dentre outras coisas, na identificação estrutural de proteínas. Além da espectrometria de massa, também seria possível verificar a expressão dos mRNAs dos diferentes subgrupos de PLA₂ nessas amostras;

- Por trabalhar com amostras de tecido cerebral *post mortem* de humanos, não foi possível verificar os efeitos causados pela PLA₂ sobre a fluidez de membranas, provavelmente por já ter ocorrido todas as alterações possíveis na membrana durante o período de óbito até a dissecação do tecido;

6.6 Perspectivas Futuras

Este estudo proporcionou novos achados a respeito da relação entre a atividade da PLA₂ e dos receptores DAs D₁ e D₂. Tais achados abrem caminho para outros estudos envolvendo a PLA₂ e outros sistemas de neurotransmissores, além de outras investigações para compreender melhor o efeito contrário que a PLA₂ exerce sobre os receptores D₁ e D₂.

Tendo isso em vista, como metas futuras propomos:

- Identificar os subgrupos de PLA₂ nas regiões cerebrais investigadas neste trabalho (além de outras de interesse) através de mRNA e/ ou espectrometria de massa;

- Fazer um novo estudo para verificar a relação entre a atividade da PLA₂ e receptores DAs, porém em outras áreas que também podem estar envolvidas na esquizofrenia (como hipocampo, hipotálamo, núcleo accumbens);
- Verificar uma possível relação entre a atividade da PLA₂ e os receptores D₃ e D₄;
- Fazer estudos para verificar a relação da PLA₂ com outros receptores, como os receptores serotoninérgicos e glutamatérgicos.

7 CONCLUSÕES

- Os experimentos de padronização para a dosagem de receptores dopaminérgicos corroboram dados da literatura (que usam técnicas diferentes), com exceção do receptor D_2 em tecido cortical, possivelmente devido à escassez desses receptores nessa região;
- A otimização das condições para a atividade da PLA_2 melhorou em 70 % em relação aos primeiros experimentos em tecido cerebral *post mortem* de humanos;
- Em CPF, CT e estriado houve o predomínio da PLA_2GVI (cerca de 85 %), podendo ser este o grupo responsável pelas alterações encontradas em esquizofrenia;
- Resultados indicaram que o aumento na atividade da PLA_2GVI aumentou a afinidade de receptores D_1 em estriado e em CPF (não houve alteração em CT), e diminuiu a afinidade de receptores D_2 em estriado;
- O aumento da atividade da PLA_2 também levou ao aumento na densidade de receptores D_1 em CPF e CT, bem como de D_2 em estriado;
- Futuros estudos são necessários para esclarecer os diferentes efeitos da PLA_2GVI sobre os receptores D_1 e D_2 , e para elucidar se e como podem contribuir para o desequilíbrio dopaminérgico em esquizofrenia.

8 REFERÊNCIAS

Abi-Dargham A. Do we still believe in the dopamine hypothesis? New data bring new evidence. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2004;7(Supp 1):S1-S5.

Abi-Dargham A, Gil R, Krystal J, Baldwin RW, Seibyl JP, Bowers M, van Dyck CH, Charney DS, Innis RB, Laruelle M. Increased striatal dopamine transmission in schizophrenia: confirmation in a second cohort. *Am J Psychiatry*. 1998;155:761-7.

Abi-Dargham A, Laruelle M. Mechanisms of action of second generation antipsychotic drugs in schizophrenia: insights from brain imaging studies. *Eur Psychiatry*. 2005;20:15-27.

Abi-Dargham A, Mawlawi O, Lombardo I, Gil R, Martinez D, Huang Y, Hwang DR, Keilp J, Kochan L, van Heertum R, Gorman JM, Laruelle M. Prefrontal dopamine D₁ receptors and working memory in schizophrenia. *J Neurosci*. 2002;22:3708-19.

Abi-Dargham A, Moore H. Prefrontal DA transmission at D₁ receptors and the pathology of schizophrenia. *The Neuroscientist*. 2003;9:404-16.

Abi-Dargham A, Rodenhiser J, Printz D, Zea-Ponce Y, Gil R, Kegeles LS, Weiss R, Cooper TB, Mann JJ, Van Heertum RL, Gorman JM, Laruelle M. From the cover: increased baseline occupancy of D₂ receptors by dopamine in schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97:8104-9.

Agranoff BW, Benjamins JA, Hajra AK. Lipids IN: Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, Molinoff PB (eds.). *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular, and Medical Aspects*. 6th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 1999. p.731-41.

Akil M, Pierri JN, Whitehead RE, Edgar CL, Mohila C, Sampson AR, Lewis DA. Lamina-specific alterations in the dopamine innervation of the prefrontal cortex in schizophrenic subjects. *Am J Psychiatry*. 1999;156:1580-9.

American Psychiatric Association (APA). *Diretrizes no tratamento da esquizofrenia*. Porto Alegre: Artmed; 2000.

Anand-Srivastava MB, Johnson RA. Role of phospholipids in coupling of adenosine and dopamine receptors to striatal adenylate cyclase. *J Neurochem.* 1981;36:1819-28.

Arnsten AFT. Adrenergic targets for the treatment of cognitive deficits in schizophrenia. *Psychopharmacology.* 2004;174:25–31.

Arnsten AFT. Catecholamine regulation of the prefrontal cortex. *J Psychopharmacol.* 1997;11:151–162.

Ashby CR Jr, Jiang LH, Kasser RJ, Wang RY. Electrophysiological characterization of 5-hydroxytryptamine sub 2 receptors in the rat medial prefrontal cortex. *J Pharmacol Exp Ther.* 1990;252:171-8.

Aston-Jones G, Shipley MT, Chouvet G, Ennis M, van Bockstaele E, Pierbone V, Shiekhataar R, Akaoka H, Drolet G, Astier B, Charley P, Valentino RJ, Williams JT. Afferent regulation of locus coeruleus neurons: Anatomy, physiology, and pharmacology. *Prog Brain Res.* 1991;88:47-75.

Atweh SF, Kuhar, MJ. Autoradiographic localization of opiate receptors in the brain. III: The telencephalon. *Brain Res.* 1977;134:393-405.

Avdulov NA, Chochina SV, Igbavboa U, O'Hare EO, Schroeder F, Cleary JP, Wood WG. Amyloid beta-peptides increase annular and bulk fluidity and induce lipid peroxidation in brain synaptic plasma membranes. *J Neurochem.* 1997;68:2086-91.

Balsinde J, Balboa MA, Insel PA, Dennis EA. Regulation and inhibition of phospholipase A₂. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1999;39:175-89.

Balsinde J, Dennis EA. Distinct roles in signal transduction for each of the phospholipase A₂ enzymes present in P388D1 macrophages. *J Biol Chem.* 1996;271:6758-65.

Balsinde J, Winstead MV, Dennis E. Phospholipase A₂ regulation of arachidonic acid mobilization. *FEBS Letters.* 2002;531:2-6.

Barch DM, Sheline YI, Csernansky JG, Snyder AZ. Working memory and prefrontal cortex dysfunction: specificity to schizophrenia compared with major depression. *Biol Psychiatry.* 2003;53:376-84.

Benes FM, Vincent SL, Alsterberg G, Bird ED, Sangivanni JP. Increased GABA_A receptor binding in superficial layers of cingulate cortex in schizophrenics. *J Neurosci.* 1992;12:924-9.

Berger GE, Wood SJ, Pantelis C, Velakoulis D, Wellard RM, McGorry PD. Implications of lipid biology for the pathogenesis of schizophrenia. *Aust N Z J Psychiatry*. 2002;36:355-66.

Bhattacharjee AK, Chang L, Lee HJ, Bazinet RP, Seemann R, Rapoport SI. D₂ but not D₁ dopamine receptor stimulation augments brain signaling involving arachidonic acid in unanesthetized rats. *Psychopharmacology*. 2005; in press.

Bigliani V, Mulligan RS, Acton PD, Ohlsen RI, Pike VW, Ell PJ, Gacinovic S, Kerwin RW, Pilowsky LS. Striatal and temporal cortical D₂/D₃ receptor occupancy by olanzapine and sertindole in vivo: a [¹²³I]epidepride single photon emission tomography (SPET) study. *Psychopharmacology (Berl)*. 2000;150:132-40.

Bigliani V, Pilowsky LS. *In vivo* neuropharmacology of schizophrenia. *Br J Psychiatry*. 1999;174(38S):23-33.

Bird OE, Spokes EG, Iversen LL. Brain norepinephrine and dopamine in schizophrenia. *Science*. 1979;204:93-4.

Bondy SC, Mckee M, Davoodbhoy YM. Prevention of chemically induced changes in synaptosomal membrane order by ganglioside GM1 and alpha-tocopherol. *Biochim Biophys Acta*. 1990;1026:213-9.

Bowden C, Theodorou AE, Cheetham SC, Lowther S, Katona CL, Crompton MR, Horton RW. Dopamine D₁ and D₂ receptors binding sites in brain samples from depressed suicides and controls. *Brain Res*. 1997;752:227-33.

Bradford PG, Marinetti GV, Abood LG. Stimulation of phospholipase A₂ and secretion of catecholamines from brain synaptosomes by potassium and A23187. *J Neurochem*. 1983;41:1684-93.

Breier A, Su TP, Saunders R, Carson RE, Kolachana BS, de Bartolomeis A, Weinberger DR, Weisenfeld N, Malhotra AK, Eckelman WC, Pickar D. Schizophrenia is associated with elevated amphetamine-induced synaptic dopamine concentrations: evidence from a novel positron emission tomography method. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94:2569-74.

Bressan RA, Erlandsson K, Jones HM, Mulligan R, Ell PJ, Pilowsky LS. Optimizing limbic selective D₂/D₃ dopamine occupancy by risperidone: A [¹²³I] epidepride SPET study. *J Clin Psychopharmacol*. 2003;23:5-14.

Bressan RA, Pilowsky LS. Hipótese glutamatérgica da esquizofrenia. *Rev Bras Psiquiatria*. 2003;25:177-83.

Brunello N, Masotto C, Steardo L, Markstein R, Racagni G. New insights into the biology of schizophrenia through the mechanism of action of clozapine. *Neuropsychopharmacology*. 1995;13:177-213.

Burnet PW, Eastwood SL, Harrison PJ. [³H]WAY-100635 for 5-HT_{1A} receptor autoradiography in human brain: a comparison with [³H]8-OHDPAT and demonstration of increased binding in the frontal cortex in schizophrenia. *Neurochem Int*. 1997;30:565-74.

Carlsson A, Hansson LO, Waters N, Carlsson ML. Neurotransmitter aberrations in schizophrenia: new perspectives and therapeutic implications. *Life Sci*. 1997;61:75-94.

Chang M. C. J., Bell J. M., Purdon A. D., Chikhale E. G., Grange E. Dynamics of docosahexaenoic acid metabolism in the central nervous system: lack of effect of chronic lithium treatment. *Neurochem Res*. 1999;24:399-406.

Chang M. C. J., Jones C. R. Chronic lithium treatment decreases brain phospholipase A₂ activity. *Neurochem Res*. 1998;23:887-92.

Chakraborti S. Phospholipase A₂ isoforms: a perspective. *Cell Signal*. 2003;15:637-65.

Chen J, Engle SJ, Seilhamer JJ, Tischfield JA. Cloning and recombinant expression of a novel human low molecular weight Ca²⁺-dependent phospholipase A₂. *J Biol Chem*. 1994;269:2365-8.

Clark JD, Schievella AR, Nalefski EA, Lin LL. Cytosolic phospholipase A₂. *J Lipid Med Cell Signal*. 1995;83-117.

Coon H, Jensen S, Holik J, Hoff M, Hoff M, Myles-Worsley M, Reimherr F, Wender P, Waldo M, Freedman R, Leppert M, Byerley W. Genomic scan for genes predisposing to schizophrenia [Abstract]. *Am J Med Genet*. 1994;54:59-71.

Cravchik A, Goldman D. Neurochemical individuality: genetic diversity among human dopamine and serotonin receptors and transporters. *Arch Gen Psychiatry*. 2000;57:1105-14.

Creese I, Burt DR, Snyder SH. Dopamine receptor binding predicts clinical and pharmacological potencies of antischizophrenic drugs. *Science*. 1976;192:481-3.

Dajas F, Barbeito L, Martinez-Pesquera G, Lista A, Puppo D, Puppo-Touriz H. Plasma noradrenaline and clinical psychopathology in schizophrenia. A correlation analysis. *Neuropsychobiology*. 1983;10:70-4.

Daniel DG, Weinberger DR, Jones DW, Zigun JR, Coppola R, Handel S, Bigelow LB, Goldberg TE, Berman KF, Kleinman JE. The effect of amphetamine on regional cerebral blood flow during cognitive activation in schizophrenia. *J Neurosci*. 1991;11:1907-17.

Dao-Castellana MH, Paillere-Martinot ML, Hantraye P, Attar-Levy D, Remy P, Crouzel C, Artiges E, Feline A, Syrota A, Martinot JL. Presynaptic dopaminergic function in the striatum of schizophrenic patients. *Schizophr Res*. 1997;23:167-74.

Dauphinais ID, DeLisi LE, Crow TJ, Alexandropoulos K, Colter N, Tuma I, Gershon ES. Reduction in temporal lobe size in siblings with schizophrenia: a magnetic resonance imaging study. *Psychiatry Res*. 1990;35:137-47.

Davis KL, Kahn RS, Ko G, Davidson M. Dopamine in schizophrenia: a review and reconceptualization. *Am J Psychiatry*. 1991;148:1474-86.

Davies MA, Sheffler DJ, Roth BL. Aripiprazole: a novel atypical antipsychotic drug with a uniquely robust pharmacology. *CNS Drug Rev*. 2004;10:317-36.

Davletov B, Perisic O, Williams RL. Calcium-dependent membrane penetration is a hallmark of the C2 domain of cytosolic phospholipase A₂ whereas the C2A domain of synaptotagmin binds membranes electrostatically. *J Biol Chem*. 1998;273:19093-6.

De Keyser J, Dierckx R, Vanderheyden P, Ebinger G, Vauquelin G. D₁ dopamine receptors in human putamen, frontal cortex and calf retina: differences in guanine nucleotide regulation of agonist binding and adenylate cyclase stimulation. *Brain Res*. 1988;443:77-84.

Dean B, Crook JM, Opeskin K, Hill C, Keks N, Copolov DL. The density of muscarinic M₁ receptors is decreased in the caudate-putamen of subjects with schizophrenia. *Mol Psychiatry*. 1996;1:54-8.

Dean B, Hussain T. Studies on dopaminergic and GABAergic markers in striatum reveals a decrease in the dopamine transporter in schizophrenia. *Schizophr Res*. 2001;52:107-14.

Dennis EA. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A₂. *J Biol Chem*. 1994;269:13057-60.

Dessen A, Tang J, Schmidt H, Stahl M, Clark JD, Seehra J, Somers WS. Crystal structure of human cytosolic phospholipase A₂ reveals a novel topology and catalytic mechanism. *Cell*. 1999;97:349-60.

Dessen A. Structure and mechanism of human cytosolic phospholipase A₂. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1488:40-7.

Deutsch SI, Rosse RB, Schwartz BL, Mastropaolo J. A revised excitotoxic hypothesis of schizophrenia: therapeutic implications. *Clin Neuropharmacol*. 2001;24:43-9.

Dewey SL, Smith GS, Logan J, Alexoff D, Ding YS, King P, Pappas N, Brodie JD, Ashby CR Jr. Serotonergic modulation of striatal dopamine measured with positron emission tomography (PET) and in vivo microdialysis. *J Neurosci*. 1995;15:821-9.

Dolan RJ, Fletcher P, Frith CD, Friston KJ, Frackowiak RS, Grasby PM. Dopaminergic modulation of impaired cognitive activation in the anterior cingulate cortex in schizophrenia. *Nature*. 1995;378:180-2.

Domyo T, Kurumaji A, Toru M. An increase in ³H-SCH 23390 binding in the cerebral cortex of post mortem brains of chronic schizophrenics. *J Neural Transm*. 2001;108:1475-84.

Dray A, Davies J, Oakley NR, Tongroach P, Vellucci S. The dorsal and medial raphe projections to the substantia nigra in the rat: electrophysiological, biochemical and behavioural observations. *Brain Res*. 1978;151:431-42.

East SZ, Brunet PW, Leslie RA, Roberts JC, Harrison PJ. 5-HT₆ receptor binding sites in schizophrenia and following antipsychotic drug administration: autoradiographic studies with ¹²⁵I-SB-258585. *Synapse*. 2002;45:191-9.

Eckert GP, Cairns NJ, Maras A, Gattaz WF, Muller WE. Cholesterol modulates the membrane-disordering effects of beta-amyloid peptides in the hippocampus: specific changes in Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2000;11:181-6.

Egan MF, Goldberg TE, Kolachana BS, Callicott JH, Mazzanti CM, Straub RE, Goldman D, Weinberger DR. Effect of COMT Val108/158 Met genotype on frontal lobe function and risk for schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98:6917-22.

Farde L, Nordstrom AL, Nyberg S, Halldin C, Sedvall G. D₁-, D₂- and 5-HT₂ receptor occupancy in clozapine treatment patients. *J Clin Psychiatry*. 1994;55:67-9.

Farde L, Nordstrom AL, Wiesel A, Pauli S, Halldin C, Sedvall G. Positron emission tomography analysis of central D₁- and D₂-dopamine receptor occupancy in patients treated with classical neuroleptics and clozapine. *Arch Gen Psychiatry*. 1992;49:538-44.

Farley IJ, Price KS, McCullough E, Deck JHN, Hordynski W, Hornykiewicz O. Norepinephrine in chronic paranoid schizophrenia: Above-normal levels in limbic forebrain. *Science*. 1978;200:456-7.

Farooqui AA, Hirashima Y, Horrocks LA. Brain phospholipases and their role in signal transduction. *Adv Exp Med Biol.* 1992;318:11-25.

Farooqui AA, Horrocks LA. Brain phospholipases A₂: a perspective on the history. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids.* 2004;71:161-9.

Farooqui AA, Litsky ML, Farooqui T, Horrocks LA. Inhibitors of intracellular phospholipase A₂ activity: their neurochemical effects and therapeutic importance for neurological disorders. *Brain Res Bull.* 1999;49:139-53.

Feinberg I. Schizophrenia: caused by a fault in programmed synaptic elimination during adolescence? *Psychiatr Res.* 1982-83;17:319-34.

Fenton WS, Hibbeln J, Knable M. Essential fatty acids, lipid membrane abnormalities, and the diagnosis and treatment of schizophrenia. *Biol Psychiatry.* 2000;47:8-21.

Fior DR, Fuxe K. Bradykinin modulation of \square_2 -adrenoreceptors in the nucleus tractus solitari of the rat: an in vitro autoradiographical study. *Neuropharmacology.* 1995;34:81-8.

Fior DR. Radioautografia quantitativa aplicada ao estudo da neurotransmissão In: Xavier GF *Técnicas para o Estudo do Sistema Nervoso.* São Paulo: Ed. Plêiade; 1999. p.33-53.

Flaum M, O'Leary DS, Swayze VW 2nd, Miller DD, Arndt S, Andreasen NC. Symptom dimensions and brain morphology in schizophrenia and related psychotic disorders. *J Psychiatr Res.* 1995;29:261-76.

Flesh I, Schimdt B, Ferber E. Acyl chain specificity and kinetic properties of phospholipase A₁ and A₂ of bone marrow-derived macrophages. *Z Naturforsch [C].* 1985;40:356-63.

Forlenza OV, Schaeffer EL, Gattaz WF. Phospholipase A₂ activity in rat embryonic brain and in primary cultures of cortical neurons. *J Neural Transm.* 2002;109:623-31.

Frieboes RM, Moises HW, Gattaz WF, Yang L, Li T, Liu X, Vetter P, Macciard F, Hwu HG, Henn F. Lack of association between schizophrenia and phospholipase A₂ genes cPLA₂ and sPLA₂. *Am J Med Genet.* 2001;105:246-9.

Friedman JI, Temporini H, Davis KL. Pharmacologic strategies for augmenting cognitive performance in schizophrenia. *Biol Psychiatry.* 1999;45:1-16.

Fukuzako H, Fukuzako T, Hashiguchi T, Kodama S, Takigawa M, Fujimoto T. Changes in levels of phosphorus metabolites in temporal lobes of drug-naive schizophrenic patients. *Am J Psychiatry.* 1999a;156:1205-8.

Fukuzako H, Fukuzako T, Kodama S, Hashiguchi T, Takigawa M, Fujimoto T. Haloperidol improves membrane phospholipid abnormalities in temporal lobes of schizophrenic patients. *Neuropsychopharmacology*. 1999b;21:542-9.

Gaser C, Nenadic I, Volz HP, Buchel C, Sauer H. Neuroanatomy of "hearing voices": a frontotemporal brain structural abnormality associated with auditory hallucinations in schizophrenia. *Cereb Cortex*. 2004;14:91-6.

Gattaz WF, Brunner J. Phospholipase A₂ and the hypofrontality hypothesis of schizophrenia. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. 1996;55:109-13.

Gattaz WF, Cairns NJ, Levy R, Förstl H, Braus DF, Maras A. Decreased phospholipase A₂ activity in the brain and in platelets of patients with Alzheimer's disease. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 1996;246:129-31.

Gattaz WF, Hübner C v K, Nevalainen TJ, Thuren T, Kinnunen PKJ. Increased serum phospholipase A₂ activity in schizophrenia: a replication study. *Biol Psychiatry*. 1990;28:495-501.

Gattaz WF, Kollisch M, Thuren T, Virtanen JA, Kunnunen PKJ. Increased plasma phospholipase A₂ activity in schizophrenic patients: reduction after neuroleptic therapy. *Biol Psychiatry*. 1987;22:421-6.

Gattaz WF, Maras A, Cairns NJ, Levy R, Förstl H. Decreased phospholipase A₂ activity in Alzheimer brains. *Biol Psychiatry*. 1995a;37:13-17.

Gattaz WF, Schmitt A, Maras A. Increased platelet phospholipase A₂ activity in schizophrenia. *Schizophr Res*. 1995b;16:1-6.

Gelb MH, Min JH, Jain MK. Do membrane-bound enzymes access their substrates from the membrane or aqueous phase: interfacial versus non-interfacial enzymes. *Biochim Biophys Acta*. 2000a;1488:20-7.

Gelb MH, Valentin E, Ghomashchi F, Lazdunski M, Lambeau G. Cloning and recombinant expression of a structurally novel human secreted phospholipase A₂. *J Biol Chem*. 2000b;275:39823-6.

Gerlach J. New antipsychotics: classification, efficacy, and, adverse effects. *Schizophr Bull*. 1991;17:289-309.

Grasby P, Malizia A, Bench C. Psychopharmacology – in vivo neurochemistry and pharmacology. *Br Med Bull*. 1996;52:513-26.

Grinder JS, Ott CE, Jackson BA. Dopamine D₁ receptor-dependent inhibition of NaCl transport in the rat thick ascending limb: mechanism of action. *Eur. J Pharmacol.* 2003;473:185-90.

Guo N, Hwang D, Lo E, Huang YH, Laruelle M, Abi-Dargham A. Dopamine depletion and in vivo binding of PET D₁ radioligands: implication for imaging studies in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology.* 2003;28:1703-11.

Haag M. Essential fatty acids and the brain. *Can J Psychiatry.* 2003;48:195-203.

Hakak Y, Walter JR, Li C, Wong WH, Davis KL, Buxbaum JD, Haroutunian V, Flenberg AA. Genome-wide expression analysis reveals dysregulation of myelination-related genes in chronic schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98:4746-751.

Hall H, Farde L, Halldin C, Lundkvist C, Sedvall G. Autoradiographic localization of 5-HT_{2A} receptors in the human brain using ³H-M 100907 and ¹¹C-M 100907. *Synapse.* 2000;38:421-31.

Hall H, Sedvall G, Magnusson O, Koopp J, Halldin C, Farde L. Distribution of D₁ dopamine and D₂ dopamine receptors, dopamine and its metabolites in the human brain. *Neuropsychopharmacology.* 1994;11:245-56.

Hall H, Wedel I. Comparisons between the in vitro binding of two substituted benzamides and two butyrophenones to dopamine – D₂ receptors in the rat striatum. *Acta Pharm Toxicol.* 1986;58:368-73.

Hamon M, Gozlan H, Mestikawy S, Emerit MB, Bolanos F, Schechter L. The central 5-HT sub 1A receptors: pharmacological, biochemical, functional, and regulatory properties. *Ann NY Acad Sci.* 1990;600:114-29.

Harrison PJ. Neurochemical alterations in schizophrenia affecting the putative receptor targets of atypical antipsychotics. Focus on dopamine (D₁, D₃, D₄) and 5-HT_{2a} receptors. *Br J Psychiatry Suppl.* 1999;38:12-22.

Hazen SL, Zupan LA, Weiss RH, Getman DP, Gross RW. Suicide inhibition of canine myocardial cytosolic calcium-independent phospholipase A₂. Mechanism-based discrimination between calcium-dependent and -independent phospholipases A₂. *J Biol Chem.* 1991;266:7227-32.

Hirabayashi T, Murayama T, Shimizu T. Regulatory mechanism and physiological role of cytosolic phospholipase A₂. *Biol Pharm Bull.* 2004;27:1168-73.

Hirabayashi T, Shimizu T. Localization and regulation of cytosolic phospholipase A₂. *Biochim Biophys Acta.* 2000;1488:124-38.

Hirvonen J, van Erp TG, Huttunen J, Aalto S, Nagren K, Huttunen M, Lonnqvist J, Kaprio J, Hietala J, Cannon TD. Increased caudate dopamine D₂ receptor availability as a genetic marker for schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry*. 2005;62:371-8.

Hoffman RE, Dobscha S. Cortical pruning and the development of schizophrenia: a computer model. *Schizophr Bull*. 1989;15:477-90.

Horrobin DF, Bennett CN. Depression and bipolar disorder: relationships to impaired fatty acid and phospholipid metabolism and to diabetes, cardiovascular disease, immunological abnormalities, cancer, ageing and osteoporosis. Possible candidate genes. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 1999a;60:217-34.

Horrobin DF, Bennett CN. New gene targets related to schizophrenia and other psychiatric disorders: enzymes, binding proteins and transport proteins involved in phospholipid and fatty acid metabolism. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 1999b;60:141-67.

Hudson C, Kennedy JL, Gotowiec A, Lin A, King N, Gojtan K, Macciardi F, Skorecki K, Meltzer HY, Warsh JJ, Horrobin DF. Genetic variant near cytosolic phospholipase A₂ associated with schizophrenia. *Schizophr Res*. 1996;21:111-6.

Huttenlocher PR. Synaptic density in human frontal cortex – developmental changes and effects of aging. *Brain Res*. 1979;163:195-205.

Jaber M, Robinson SW, Missale C, Caron MG. Dopamine receptors and brain function. *Neuropharmacology*. 1996;35:1503-19.

Jakala P, Riekkinen M, Sirvio J, Koivisto E, Kejonen K, Vanhanen M, Riekkinen PJ. Guanfacine, but not clonidine, improves planning and working memory performance in humans. *Neuropsychopharmacology*. 1999a;20:460–70.

Jakala P, Sirvio J, Riekkinen M, Koivisto E, Kejonen K, Vanhanen M, Riekkinen PJ. Guanfacine and clonidine, alpha-2 agonists, improve paired associates learning, but not delayed matching to sample, in humans. *Neuropsychopharmacology*. 1999b;20:119–30.

Jenkins CM, Wolf MJ, Mancuso DJ, Groos RW. Identification of the calmodulin-binding domain of recombinant calcium-independent phospholipase A₂ β . *J Biol Chem*. 2001;276:7129-35.

Jennes L, Traurig HH, Conn PM. Atlas of the human brain. Lippincott Company, Pennsylvania, USA, 1995.

Jones C, Kapur S, Remington G, Zipursky RB. Transient dopamine D₂ occupancy in low EPS-incidence drugs: PET evidence [Abstract]. *Biol Psychiatry*. 2000;47(Suppl 1):S112.

Junqueira R, Cordeiro Q, Meira-Lima I, Gattaz WF, Vallada H. Allelic association analysis of phospholipase A₂ genes with schizophrenia. *Psychiatr Genet*. 2004;14:157-60.

Kahn RS, Harvey PD, Davidson M, Keefe RS, Apter S, Neale JM, Mohs RC, Davis KL. Neuropsychological correlates of central monoamine function in chronic schizophrenia: relationship between CSP metabolites and cognitive functions. *Schizophr Res*. 1994;11:217-74.

Kapur S, Remington G. Serotonin-dopamine interaction and its relevance to schizophrenia. *Am J Psychiatry*. 1996;153:466-73.

Kapur S, Seeman P. Does fast dissociation from the dopamine D₂ receptor explain the action of atypical antipsychotics? A new hypothesis. *Am J Psychiatry*. 2001;158:360-9.

Kapur S, Zipursky RB, Jones C, Shammi CS, Remington G, Seeman P. A positron emission tomography study of quetiapine in schizophrenia: a preliminary finding of an antipsychotic effect with only transiently high dopamine D₂ receptor occupancy. *Arch Gen Psychiatry*. 2000;57:553-9.

Kegeles LS, Abi-Dargham A, Zea-Ponce Y, Rodenhiser-Hill J, Mann JJ, van Heertum RL, Cooper TB, Carlsson A, Laruelle M. Modulation of amphetamine-induced striatal dopamine release by ketamine in humans: implications for schizophrenia. *Biol Psychiatry*. 2000;48:627-40.

Kegeles LS, Zea-Ponce Y, Abi-Dargham A, Rodenhiser J, Wang T, Weiss R, van Heertum RL, Mann JJ, Laruelle M. Stability of [¹²³I]IBZM SPECT measurement of amphetamine-induced striatal dopamine release in humans. *Synapse*. 1999;31:302-8.

Kemali D, DelVeccio M, Maj M. Increased noradrenaline levels in CSF and plasma of schizophrenic patients. *Biol Psychiatry*. 1982;17:711-7.

Kerwin RW, Pilowsky LS. Traditional receptor theory and its application to neuroreceptor measurements in functional imaging. *Eur J Nucl Med*. 1995;22:699-710.

Kim JS, Kornhuber HH, Schmid-Burgk W, Holzmüller B. Brain cerebrospinal fluid glutamate in schizophrenic patients and a new hypothesis on schizophrenia. *Neurosci Lett*. 1980;20:379-82.

Knable MB, Hyde TM, Murray AM, Herman MM, Kleinman JE. A post mortem study of frontal cortical dopamine D₁ receptors in schizophrenic, psychiatric controls, and normal controls. *Biol Psychiatry*. 1996;40:1191-9.

Köler C, Radesäter AC. Autoradiographic visualization of dopamine D₂ receptors in the monkey brain using the selective benzamide drug ³H-raclopride. *Neurosc Lett*. 1986;66:85-90.

Konradi C, Heckers S. Molecular aspects of glutamate dysregulation: implications for schizophrenia and its treatment. *Pharmacol Ther*. 2003;97:153-79.

Kudo I, Murakami M. Phospholipase A₂ enzymes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2002;68-69:3-58.

Laduron PM. Criteria for the receptor site in binding studies. *Biochem Pharmacol*. 1984;33:833-9.

Lake CR, Sternberg DE, van Kammen DP, Ballenger C, Ziegler MG, Post RM, Kopin IJ, Bunney WE. Schizophrenia: Elevated cerebrospinal fluid norepinephrine. *Science*. 1980;207:331-3.

Larsson Forsell PKA, Kennedy BP, Claesson HE. The human calcium-independent phospholipase A₂ gene: multiple enzymes with distinct properties from a single gene. *Eur J Biochem*. 1999;262:575-85.

Larsson PKA, Claesson HE, Kennedy BP. Multiple splice variants of the human calcium-independent phospholipase A₂ and their effect on enzyme activity. *J Biol Chem*. 1998;273:207-14.

Laruelle M, Casanova M, Weinberger D, Kleinman J. Postmortem study of the dopaminergic D₁ receptors in the dorsolateral prefrontal cortex of schizophrenic and controls. *Schizophr Res*. 1990;3:30-1.

Laruelle M, Abi-Dargham A, Gil R, Kegeles L, Innis R. Increased dopamine transmission in schizophrenia: relationship to illness phases. *Biol Psychiatry*. 1999;46:56-72.

Lasch J, Willhardt I, Kinder D, Sauer H, Smesny S. Fluorometric assays of phospholipase A₂ activity with three different substrates in biological samples of patients with schizophrenia. *Clin Chem Lab Med*. 2003;41:908-14.

Lee EY, Chen H, Shepherd KR, Lamargo NS, Soliman KFA, Charlton CG. Inhibitory effects of lysophosphatidylcholine on the dopaminergic system. *Neurochem Res*. 2004;29:1333-42.

Lee EY, Soliman KFA, Charlton CG. Lysophosphatidylcholine decreases locomotor activities and dopamine turnover rate in rats. *NeuroToxicology*. 2005;26:27-38.

- Leslie CC. Properties and regulation of cytosolic phospholipase A₂. *J Biol Chem*. 1997;272:16709-12.
- Lichtenbergova L, Yoon ET, Cho W. Membrane penetration of cytosolic phospholipase A₂ is necessary for its interfacial catalysis and arachidonate specificity. *Biochemistry*. 1998;37:14128-36.
- Liddle PF. *Schizophrenia – the clinical picture*. Chap 7, IN Seminars in General Adult Psychiatry. Gaskell, Royal College of Psychiatrists: Ed. Stein G. & Wilkinson. 1998.
- Lieberman JA. Is schizophrenia a neurodegenerative disorder? A clinical and neurobiological perspective. *Biol Psychiatry*. 1999;46:729-39.
- Lindstrom LH, Gefvert O, Hagberg G, Lundberg T, Bergstrom M, Hartvig P, Langstrom B. Increased dopamine synthesis rate in medial prefrontal cortex and striatum in schizophrenia indicated by L(beta-¹¹C) DOPA and PET. *Biol Psychiatry*. 1999;46:681-8.
- Lio Y-C, Reynolds LJ, Balsinde J, Dennis EA. Irreversible inhibition of Ca²⁺ - independent phospholipase A₂ by methyl arachidonyl fluorophosphonate. *Biochim Biophys Acta*. 1996;1302:55-60.
- Lio Yi-C, Dennis EA. Interfacial activation, lysophospholipase and transacyclase activity of Group VI Ca²⁺-independent phospholipase A₂. *Bioch Biophys Acta*. 1998;1392:320-32.
- Lowry OH, Rowebrough NJ, Farr LA, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193:265-75.
- MacDonald DJ, Boyle RM, Glen ACA, Ross BM, Glen AIM, Ward PE, McKinney SB, Peterkin MA. The investigation of phospholipase A₂ using ELISA. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. 2004;70:377-81.
- Mancuso DJ, Jenkins CM, Gross RW. The genomic organization, complete mRNA sequence, cloning, and expression of a novel human intracellular membrane-associated calcium-independent phospholipase A₂. *J Biol Chem*. 2000;275:9937-45.
- Mao Z-M, Arnsten AFT, Li B-M. Local infusion of alpha-1 adrenergic agonist into the prefrontal cortex impairs spatial working memory performance in monkeys. *Biol Psychiatry*. 1999;46:1259–65.
- Mason ST. Noradrenaline in the brain: Progress in theories of behavioural function. *Prog Neurobiol*. 1981;16:263-303.

Meador-Woodruff JH IN: Gattaz WF, Häfner H. *Search for the causes of schizophrenia, balance of the century*. 1999.p.251-60.

Mellor J, Laugharne J, Peet M. Omega-3 fatty acid supplementation in schizophrenic patients. *Hum Psychopharmacology*. 1996;11:39-46.

Millan MJ, Gressier H, Brocco M. The dopamine D₃ receptor antagonist, (+)-S 14297, blocks the cataleptic properties of haloperidol in rats. *Eur J Pharmac*. 1997;321:R7-R9.

Mirnics K, Middleton FA, Marquez A, Lewis DA, Levitt P. Molecular characterization of schizophrenia viewed by microarray analysis of gene expression in prefrontal cortex. *Neuron*. 2000;28:53-67.

Molinoff PB. *Receptors and effector Mechanisms* IN: Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, Molinoff PB. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular, and Medical Aspects* 6th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 1999. p.45-59.

Müller WE, Koch S, Scheuer K, Rostock A, Bartsch R. Effects of piracetam on membrane fluidity in the aged mouse, rat, and human brain. *Biochem Pharmacol*. 1997;53:135-40.

Myers CS, Contreras MA, Chang MCJ, Rapoport SI, Appel NM. Haloperidol downregulates phospholipase A₂ signaling in rat basal ganglia circuits. *Brain Res*. 2001;896:96-101.

Nalefski EA, Sultzman LA, Martin DM, Kriz RW, Towler PS, Knopf JL, Clark JD. Delineation of two functionally distinct domains of cytosolic phospholipase A₂, a regulatory Ca²⁺-dependent lipid-binding domain and a Ca²⁺-independent catalytic domain. *J Biol Chem*. 1994;269:18239-49.

Nalefski EA, Falke JJ. The C2 domain calcium-binding motif: structural and functional diversity. *Protein Sci*. 1996;5:2375-90.

Nalefski EA, McDonagh T, Somers W, Seehra J, Falke JJ, Clark JD. Independent folding and ligand specificity of the C2 calcium-dependent lipid binding domain of cytosolic phospholipase A₂. *J Biol Chem*. 1998;273:1365-72.

Noponen M, Sanfilipo M, Samanich H, Ryer H, Ko G, Angrist B, Wolkin A, Duncan E, Rotrosen J. Elevated PLA₂ activity in schizophrenics and other psychiatric patients. *Biol Psychiatry*. 1993;34:641-9.

Nordstrom AL, Farde L, Nyberg S, Karlsson P, Halldin C, Sedvall G. D₁, D₂, 5-HT₂ receptor occupancy in relation to clozapine serum concentration: a PET study of schizophrenic patients. *Am J Psychiatry*. 1995;152:1444-9.

Nyberg S, Farde L, Eriksson L, Halldin C, Eriksson B. 5-HT₂ and D₂ dopamine receptor occupancy in the living human brain by risperidone. *Psychopharmacology*. 1993;110:265-72.

O'Keane V, Abel K, Murray RM. Growth hormone responses to pyridostigmine in schizophrenia: evidence for cholinergic dysfunction. *Biol Psychiatry*. 1994;36:582-8.

Ohmichi M, Hirota K, Koike K, Kadowaki K, Miyake A, Kiyama H, Tohyama M, Tanizawa O. Involvement of extracellular calcium and arachidonate in ³H-dopamine release from rat tuberoinfundibular neurons. *Neuroendocrinology*. 1989;50:481-87.

Okubo Y, Suhara T, Suzuki K, Kobayashi K, Inoue O, Terasaki O, Someya Y, Sassa T, Sudo Y, Matsushima E, Ito M, Tateno Y, Toru M. Decreased prefrontal dopamine D₁ receptors in schizophrenia revealed by PET. *Nature*. 1997;385:634-6.

Oliveira CR, Duarte EP, Carvalho AP. Effect of phospholipase digestion and lysophosphatidylcholine on dopamine receptor binding. *J Neurochem*. 1984;43:455-65.

Organização Mundial de Saúde (OMS). *Classificação de transtornos mentais e de comportamento da CID-10: Descrição Clínica e Diretrizes diagnósticas*. Porto Alegre: Artes Médicas; 1993.

Pae CU, Yu HS, Lee KU, Kim JJ, Lee CU, Lee SJ, Jun TY, Lee C, Paik IH. BanI polymorphism of the cytosolic phospholipase A₂ gene may confer susceptibility to the development of schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2004;28:739-41.

Pangerl AM, Steudle A, Jaroni HW, Rüfer R, Gattaz WF. Increased platelet membrane lysophosphatidylcholine in schizophrenia. *Biol Psychiatry*. 1991;30:837-40.

Pazos A, Probst A, Palacios JM. Autoradiographic mapping of serotonin-2 receptors. *Neuroscience*. 1987;21:123-39.

Pedigo NW, Yamamura HI, Nelson DL. Discrimination of multiple ³H-5-hydroxy tryptamine binding sites by the neuroleptic spiperone in rat brain. *J Neurochem*. 1981;36:220-6.

Peet M, Mellor J. Double blind placebo-controlled trial of omega-3 polyunsaturated fatty acids as an adjunct to neuroleptics. *Schizophr Res*. 1998;29:160-161.

Peet M, Ramchand CN, Lee J, Telang SD, Vankar GK, Shah S, Wei J. Association of the BanI dimorphic site at the human cytosolic phospholipase A₂ gene with schizophrenia. *Psychiatr Genet*. 1998;8:191-2.

- Perisic O, Fong S, Lynch DE, Bycroft M, Williams RL. Crystal structure of a calcium-phospholipid binding domain from cytosolic phospholipase A₂. *J Biol Chem*. 1998;273:1596-604.
- Perisco AM, Wang ZW, Black DW, Andreasen NC, Uhl GR, Crowe RR. Exclusion of close linkage with the dopamine transporter gene with schizophrenia spectrum disorders. *Am J Psychiatry*. 1995;152:134-6.
- Peroutka SJ, Snyder SH. Relationship of neuroleptic drug effects at brain dopamine, serotonin, α -adrenergic, and histamine receptors to clinical potency. *Am J Psychiatry*. 1980;137:1518-22.
- Pettegrew JW, Keshavan MS, Panchalingam K, Strychor S, Kaplan DB, Tretta MG, Allen M. Alterations in brain high-energy phosphate and membrane phospholipid metabolism in first-episode, drug-naive schizophrenics. *Arch Gen Psychiatry*. 1991;48:563-8.
- Pickard RT, Striffler BA, Kramer RM, Sharp JD. Molecular cloning of two new human paralogs of 85-kDa cytosolic phospholipase A₂- β . *J Biol Chem*. 1999;274:8823-31.
- Pilowsky LS, Kerwin RW, Murray RM. Schizophrenia: a neurodevelopmental perspective. *Neuropsychopharmacology*. 1993;9:83-91.
- Pilowsky L, Mulligan RS, Acton PD, Ell PJ, Costa DC, Kerwin RW. Limbic selectivity of clozapine. *Lancet*. 1997;350:490-1.
- Plaznik A, Pucilowski O, Kostowski W, Bidzinski A, Hauptmann M. Rotational behaviour produced by unilateral ventral noradrenergic bundle lesions: Evidence for a noradrenergic-dopaminergic interaction in the brain. *Pharmacol Biochem Behav*. 1982;17:619-22.
- Pycock CJ, Kerwin RW, Carter CJ. Effect of lesion of cortical dopamine terminals on subcortical dopamine in rats. *Nature*. 1980;286:74-7.
- Rapoport JL, Addington AM, Frangou S, Psych MR. The neurodevelopmental model of schizophrenia. *Mol Psychiatry*. 2005; in press.
- Raedler TJ, Knable MB, Jones DW, Urbina RA, Gorey JG, Lee KS, Egan MF, Coppola R, Weinberger DR. In vivo determination of muscarinic acetylcholine receptor availability in schizophrenia. *Am J Psychiatry*. 2003;160:118-27.
- Reynolds. Receptor mechanisms in the treatment of schizophrenia. *J Psychopharmacol*. 2004;18:340-5.

Riemann D, Hohagen F, Krieger S, Gann H, Muller WE, Olbrich R, Wark HJ, Bohus M, Low H, Berger M. Cholinergic REM induction test: muscarinic supersensitivity underlies polysomnographic findings in both depression and schizophrenia. *J Psychiatr Res.* 1994;28:195-210.

Riendeau D, Guay J, Weech PK, Laliberté F, Yergey J, Li C, Desmarais S, Perrier H, Liu S, Nicoll-Griffith D, Street IP. Arachidonyl trifluoromethyl ketone, a potent inhibitor of 85-kDa phospholipase A₂, blocks production of arachidonate and 12-hydroxyeicosatetraenoic acid by calcium ionophore-challenged platelets. *J Biol Chem.* 1994;269:15619-24.

Rizo J, Südhof TC. C₂-domains, structure and function of a universal Ca²⁺-binding domain. *J Biol Chem.* 1998;273:15879-82.

Robbins TW. The case for frontostriatal dysfunction in schizophrenia. *Schizophr Bull.* 1990;16:391-402.

Ropohl A, Sperling W, Elstner S, Tomandl B, Reulbach U, Kaltenhauser M, Kornhuber J, Maihofner C. Cortical activity associated with auditory hallucinations. *Neuroreport.* 2004;15:523-6.

Ross BM, Hudson C, Erlich J, Warsh JJ, Kish SJ. Increased phospholipid breakdown in schizophrenia: Evidence for the involvement of a calcium-independent phospholipase A₂. *Arch Gen Psychiatry.* 1997;54:487-94.

Ross BM, Kim DK, Bonventre JV, Kish S. Characterization of a novel phospholipase A₂ activity in human brain. *J Neurochem.* 1995;64:2213-21.

Ross BM, Moszczynska A, Erlich J, Kish SJ. Low activity of key phospholipid catabolic and anabolic enzymes in human substantia nigra: possible implications for Parkinson's disease. *Neuroscience.* 1998a;83:791-98.

Ross BM, Moszczynska A, Erlich J, Kish SJ. Phospholipid-metabolizing enzymes in Alzheimer disease: increased phospholipid acyltransferase activity and decreased phospholipase A₂ activity *J Neurochem.* 1998b;70:786-93.

Ross BM, Moszczynska A, Peretti FJ, Adams V, Schmunk GA, Kalasinsky KS, Ang L, Mamalias N, Turenne SD, Kish SJ. Decreased activity of brain phospholipid metabolic enzymes in human users of cocaine and methamphetamine. *Drug Alcohol Depend.* 2002;67:73-9.

Ross BM, Turenne S, Moszczynska A, Warsh JJ, Kish SJ. Differential alteration of phospholipase A₂ activities in brain of patients with schizophrenia. *Brain Res.* 1999;821:407-13.

Ross BM, Moszczynska A, Kalasinsky K, Kish SJ. Phospholipase A₂ activity is selectively decreased in the striatum of chronic cocaine users. *J Neurochem.* 1996;67:2620-3.

Rybakowski JK, Borkowska A, Czerski PM, Dmitrzak-Weglarz M, Hauser J. The study of cytosolic phospholipase A₂ gene polymorphism in schizophrenia using eye movement disturbances as an endophenotypic marker. *Neuropsychobiology.* 2003;47:115-9.

Schaeffer EL. *A inibição da atividade da fosfolipase A₂ no hipocampo de ratos prejudica a formação da memória de curta e de longa duração: implicações para a doença de Alzheimer* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2004.

Schaeffer EL, Bass FJr, Gattaz WF. Inhibition of phospholipase A₂ activity reduces membrane fluidity in rat hippocampus. *J Neural Transm.* 2005;112:641-7.

Schaeffer EL, Gattaz WF. Inhibition of calcium-independent phospholipase A₂ activity in rat hippocampus impairs short- and long-term memory formation. *Psychopharmacology (Berl).* 2005; in press.

Schmitt A, Maras A, Petroianu G, Braus DF, Scheuer L, Gattaz WF. Effects of antipsychotic treatment on membrane phospholipid metabolism in schizophrenia. *J Neural Transm.* 2001;108:1081-91.

Seeman P. Dopamine receptors and the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Synapse.* 1987;1:133-52.

Shah S, Vankar K, Telang SD, Ramchand CN, Peet M. Eicosapentaenoic acid (EPA) as an adjunct in the treatment of schizophrenia. 9th Biennial Winter Workshop on Schizophrenia, Davos, Switzerland, 1998; february.

Sharp JD, White DL. Cytosolic PLA₂: mRNA levels and potential for transcriptional regulation. *J Lipid Mediators.* 1993;8:183-9.

Sibley DR, Monsma FJ. Molecular biology of dopamine receptors. *TIPS reviews.* 1992;13:61-9.

Sidhu A, Niznik HB. Coupling of dopamine receptor subtypes to multiple and diverse G proteins. *Int J Devl Neuroscience.* 2000;18:669-77.

Silva VS, Cordeiro JM, Matos MJ, Oliveira CR, Gonçalves PP. Aluminum accumulation and membrane fluidity alteration in synaptosomes isolated from rat brain cortex following aluminum ingestion: effect of cholesterol. *Neurosci Res.* 2002;44:181-93.

Simpson MDC, Slater P, Deakin JFW, Royston MC, Skan WJ. Reduced GABA uptake sites in the temporal lobe in schizophrenia. *Neurosci Lett*. 1989;107:211-5.

Simpson MDC, Slater P, Royston MC, Deakin JF. Regionally selective deficits in uptake sites for glutamate and gamma-aminobutyric acid in the basal ganglia in schizophrenia. *Psychiatry Res*. 1992;42:273-82.

Singer IA. *Final Report* (FAPESP). São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2002.

Six DA, Dennis EA. The expanding superfamily of phospholipase A₂ enzymes: classification and characterization. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1488:1-19.

Smesny S, Kinder D, Wilhardt I, Rosburg T, Lasch J, Berger G, Sauer H. Increased calcium-independent phospholipase A₂ activity in first but not in multiepisodic chronic schizophrenia. *Biol Psychiatry*. 2005;57:399-405.

Song C, Chang X -J, Bean KM, Proia MS, Knopf JL, Kriz RW. Molecular characterization of cytosolic phospholipase A₂- β . *J Biol Chem*. 1999;274:17063-67.

Stanley JA, Williamson PC, Drost DJ, Carr TJ, Rylett R, Malla A, Thompson RT. An in vivo study of the prefrontal cortex of schizophrenia patients at different stages of illness via phosphorus magnetic resonance spectroscopy. *Arch Gen Psychiatry*. 1995;52:399-406.

Stephenson CM, Bigliani V, Jones HM, Mulligan RS, Acton PD, Visvikis D, Ell PJ, Kerwin RW, Pilowsky LS. Striatal and extra-striatal D₂/D₃ dopamine receptor occupancy by quetiapine in vivo. [¹²³I]-epidepride single photon emission tomography (SPET) study. *Br J Psychiatry*. 2000;177:408-15.

Stewart A, Ghosh M, Spencer DM, Leslie CC. Enzymatic properties of human cytosolic phospholipase A₂ γ . *J Biol Chem*. 2002;277:29526-36.

Suzuki N, Ishizaki J, Yokota Y, Higashino K, Ono T, Ikeda M, Fujii N, Kawamoto K, Hanasaki K. Structures, enzymatic properties, and expression of novel human and mouse secretory phospholipase A₂s. *J Biol Chem*. 2000;275:5785-93.

Tanaka H, Takeya R, Sumimoto H. A novel intracellular membrane-bound calcium-independent phospholipase A₂. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;272:320-6.

Tandon R, DeQuardo JR, Goodson J, Mann NA, Greden JF. Effect of anticholinergics on positive and negative symptoms in schizophrenia. *Psychopharmacol Bull*. 1992;28:297-302.

Tang SW, Helmeste DM, Fang H, Li M, Vu R, Bunney W Jr, Potkin S, Jones EG. Differential labeling of dopamine and sigma sites by ^3H -nemonapride and ^3H -raclopride in post mortem human brain. *Brain Res.* 1997;765:7-12.

Tavares H. *O teste da niacina, a atividade da fosfolipase A₂ e os níveis de prostaglandina E2 na esquizofrenia e nos transtornos do humor* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2002.

Tavares H, Yacubian J, Talib LL, Barbosa NR, Gattaz WF. Increased phospholipase A₂ activity in schizophrenia with absent response to niacin. *Schizophr Res.* 2003;61:1-6.

Templeton WW, Woodruff GN. A comparison of some of the properties of the [^3H]-sulpiride binding site in soluble and native membrane preparations of dog striatum. *Br J Pharmac.* 1983;78:5-7.

Toplak H, Batchiulis V, Hermetter A, Hunziker T, Honegger UE, Wiesmann UN. Effects of culture and incubation conditions on membrane fluidity in monolayers of cultured cells measured as fluorescence anisotropy using trimethylammonium diphenylhexatriene (TMA-DPH). *Biochim Biophys Acta.* 1990;1028:67-72.

Trantham-Davidson H, Neely LC, Lavin A, Seamans JK. Mechanisms underlying differential D₁ versus D₂ dopamine receptor regulation of inhibition in prefrontal cortex. *J Neurosc.* 2004;24:10652-9.

Underwood KW, Song C, Kriz RW, Chang XJ, Knopf JL, Lin LL. A novel calcium-independent phospholipase A₂, cPLA₂- γ that is prenylated and contains homology to cPLA₂. *J Biol Chem.* 1998;273:21926-32.

Van Kammen DP, Peters J, van Kammen WB, Nugent A, Goetz KL, Yao J, Linnoila M. CSF norepinephrine in schizophrenia is elevated prior to relapse after haloperidol withdrawal. *Biol Psychiat.* 1989;26:176-88.

Weinberger DR, Berman KF, Chase TN. Mesocortical dopaminergic function and human cognition. *Ann N Y Acad Sci.* 1988;537:330-8.

Weinberger DR. Implications of normal brain development for the pathogenesis of schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry.* 1987;44:660-9.

Wilson JM, Sanyal S, Van Tol HHM. Dopamine D₂ and D₄ receptor ligands: relation to antipsychotic action. *Eur J Pharm.* 1998;351:273-86.

Winstead MV, Balsinde J, Dennis EA. Calcium-independent phospholipase A₂: structure and function. *Biochim Biophys Acta.* 2000;1499:28-39.

Wolf MJ, Gross RW. The calcium-dependent association and functional coupling of calmodulin with myocardial PLA₂. *J Biol Chem*. 1996;271:20989-92.

Wolf MJ, Wang J, Turk J, Gross RW. Depletion of intracellular calcium stores activates smooth muscle cell calcium-independent PLA₂. *J Biol Chem*. 1997;272:1522-6.

Wolf RA, Gross RW. Identification of neutral active phospholipase C which hydrolyses choline glycerophospholipids and plasmalogen selective phospholipase A₂ in canine myocardium. *J Biol Chem*. 1985;260:7295-303.

Wong AHC, Buckle CE, Van Tol HHM. Polymorphisms in dopamine receptors: what do they tell us?. *Eur J Pharm*. 2000;410:183-203.

Wong AHC, Van Tol HHM. Schizophrenia: from phenomenology to neurobiology. *Neurosci Biobehav Reviews*. 2003;27:269-306.

Xiberas X, Martinot JL, Mallet L, Artiges E, Loc'HC, Maziere B, Paillere-Martinot ML. Extrastriatal and striatal D₂ dopamine receptor blockade with haloperidol or new antipsychotic drugs in patients with schizophrenia. *Br J Psychiatry*. 2001;179:503-8.

Xu GY, McDonagh T, Yu HA, Nalefski EA, Clark JD, Cumming DA. Solution structure and membrane interactions of C2 domain of cytosolic phospholipase A₂. *J Mol Biol*. 1998;280:485-500.

Yacubian J, Castro CC, Ometto M, Barbosa E, Camargo CP, Tavares H, Cerri GG, Gattaz WF. ³¹P-spectroscopy of frontal lobe in schizophrenia: alterations in phospholipid and high-energy phosphate metabolism. *Schizophr Res*. 2002;58:117-22.

Yang HC, Mosior M, Johnson CA, Chen Y, Dennis EA. Group-specific assay that distinguishes between the four major types of mammalian phospholipase A₂. *Analytical Biochemistry*. 1999;269:278-88.

Yao JF, Leonard S, Reddy R. Membrane phospholipid abnormalities in post mortem brains from schizophrenic patients. *Schizophr Res*. 2000;42:7-17.

Yokoi F, Grunder G, Biziere K, Stephane M, Dogan AS, Dannals RF, Ravert H, Suri A, Bramer S, Wong DF. Dopamine D₂ and D₃ receptor occupancy in normal humans treated with the antipsychotic drug aripiprazole (OPC 14597): a study using positron emission tomography and [¹¹C]raclopride. *Neuropsychopharmacology*. 2002;27:248-59.

Zoli M, Agnati LF, Hedlund PB, Li XM, Ferre S, Fuxe K. Receptor-receptor interactions as an integrative mechanism in nerve cells. *Mol Neurobiol*. 1993;7:293-334.