

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

**EFEITOS DO ANTIPSICÓTICO PUTATIVO ALSTONINA EM PARÂMETROS NEUROQUÍMICOS  
GLUTAMATÉRGICOS RELEVANTES À PATOFISIOLOGIA DA ESQUIZOFRENIA**

ANA PAULA HERRMANN

PORTO ALEGRE

2011

ANA PAULA HERRMANN

**EFEITOS DO ANTIPSICÓTICO PUTATIVO ALSTONINA EM PARÂMETROS NEUROQUÍMICOS  
GLUTAMATÉRGICOS RELEVANTES À PATOFISIOLOGIA DA ESQUIZOFRENIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica como requisito para a obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Elaine Elisabetsky

Coorientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Saraiva Gonçalves

PORTO ALEGRE

2011

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família, em especial aos meus pais, Susana e Paulo, pelo apoio, em todos os níveis, pelo incentivo à educação e pelos bons exemplos.

Agradeço ao meu irmão, Eduardo, pela parceria e pelas instruções instantâneas sobre edição de imagens no Photoshop®.

Agradeço ao Ângelo pela companhia confortante de todas as horas, pelos momentos agradáveis, pelo seu senso de humor adorável que tanto me diverte e me faz rir, e por ser “bonito, esforçado e trabalhador”.

Agradeço à minha orientadora, Elaine, pelos ensinamentos proporcionados, pelas histórias contadas, pelas experiências possibilitadas, pela paciência dispensada, pela oportunidade concedida, pelas risadas compartilhadas e pelos chás oferecidos.

Agradeço ao meu coorientador, CA, pela colaboração e pela confiança e liberdade cedidas ao disponibilizar a infraestrutura e os recursos humanos do Laboratório 33 para a realização de todos os experimentos propostos.

Agradeço à minha tutora de fatias, Paula Lunardi, pelo trabalho árduo, pelo empenho exemplar, pela dedicação, pelo interesse, pela paciência, pela ótima companhia, pelo jeito bacana de ser, pelos melhores comentários e pelas melhores piadas espontâneas.

Agradeço ao pessoal do Laboratório 33, onde conheci muitas pessoas ótimas, pelo espaço e por toda a ajuda, seja na hora de trocar o meio, na hora de emprestar uma mão extra nos segundos críticos ou na hora de ensinar os passos de um protocolo.

Agradeço à minha ex-chefinha, preciosa colega e amiga pra toda vida, Viviane Linck, pela parceria permanente (científica e não-científica), pela graça, pela conversa, pela polianice, pela alegria inabalável, pelo corpo fechado e por formar comigo “A Resistência”.

Agradeço à “minha” IC, Luísa Pilz, pela evidente competência, pela companhia agradável, pela tranquilidade, pela dedicação e pelo trabalho intenso na temporada em que esteve ao meu dispor.

Agradeço a todos do Laboratório de Etnofarmacologia, aos que estão hoje e aos que estiveram antes, pela presença, pela ajuda mútua constante, pela solidariedade, pelo coleguismo, pela diversão, pela parceria e por aguentarem a Glorinha, na medida do possível.

Agradeço a todos os meus amigos, incluídos aqui os eternos colegas da Biomedicina, pela torcida e pela amizade, e em especial à Talita, pela paciência em ouvir e aconselhar e por ter presenciado de perto as principais cenas dos últimos capítulos.

Agradeço aos funcionários Ângela, Cleia, Patrícia e pessoal dos biotérios pelos serviços prestados, e à Dona Jane pelo seu humor inocente e não intencional.

**SUMÁRIO****PARTE I**

<b>RESUMO</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>2</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	<b>3</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>4</b>
<b>1.1 Esquizofrenia</b>	<b>4</b>
<b>1.1.1 Hipótese dopaminérgica</b>	<b>6</b>
<b>1.1.2 Hipótese glutamatérgica</b>	<b>7</b>
<b>1.2 Neurotransmissão glutamatérgica</b>	<b>9</b>
<b>1.2.1 Interação neurônio-glia</b>	<b>12</b>
<b>1.3 Envolvimento da glia na esquizofrenia</b>	<b>13</b>
<b>1.3.1 Proteína S100B</b>	<b>14</b>
<b>1.4 Antipsicóticos</b>	<b>16</b>
<b>1.4.1 Alstonina</b>	<b>17</b>
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>20</b>
<b>2.1 Objetivo geral</b>	<b>20</b>
<b>2.2 Objetivos específicos</b>	<b>20</b>

**PARTE II**

<b>3 CAPÍTULO I</b>	<b>21</b>
<b>3.1 Effects of haloperidol, clozapine and the putative antipsychotic alstonine on glutamate uptake in acute hippocampal slices</b>	<b>21</b>

**PARTE III**

<b>4 DISCUSSÃO E PERSPECTIVAS</b>	<b>58</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>63</b>

## RESUMO

**Relevância:** A esquizofrenia é hoje entendida como um grupo de psicoses caracterizadas por alterações de pensamento, sentimentos e relação com o mundo. Entre os sintomas inclui-se a capacidade cognitiva severamente afetada, hoje incluída na própria caracterização da doença. A hipótese glutamatérgica da esquizofrenia tem foco atual graças ao acúmulo de evidências quanto ao envolvimento do sistema glutamatérgico na neurobiologia da doença, bem como pela sua relevância nos déficits cognitivos determinantes da baixa qualidade de vida dos pacientes. Acredita-se que a atividade dos transportadores de glutamato seja um fator determinante da concentração de glutamato extracelular, sua difusão para sítios extrasinápticos (*spillover*) e, em última análise, da ativação de receptores pré-, pós- e extrasinápticos. Assim, alterações na “sinapse tripartite” adquirem importância por seu potencial envolvimento em diversas condições neurológicas e psiquiátricas. Especificamente quanto à esquizofrenia, tem-se sugerido que um aumento da captação de glutamato poderia contribuir para o estado de hipofunção glutamatérgica potencialmente implicado na doença. Assim, a modulação do transporte de glutamato pode representar um novo alvo para o desenvolvimento de novos antipsicóticos. Alstonina foi identificada como componente majoritário de um extrato de planta usado por psiquiatras tradicionais na Nigéria em pacientes com doença mental. Apresenta perfil claramente antipsicótico, mais próximo de antipsicóticos atípicos que típicos, em modelos animais relevantes à esquizofrenia. O seu mecanismo de ação não está claramente definido, mas aparentemente não envolve receptores dopaminérgicos, e receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>2A/C</sub> estão envolvidos nos efeitos de alstonina em modelos de sintomas positivos, negativos e cognitivos. **Objetivos:** Dando continuidade à caracterização de alstonina como fármaco antipsicótico, objetivou-se a análise dos efeitos de alstonina em parâmetros neuroquímicos relevantes à patofisiologia da esquizofrenia. **Métodos:** Utilizando fatias hipocámpais agudas, o antipsicótico típico haloperidol (10 µM), o atípico clozapina (10 e 100 µM) e alstonina (1-100 µM) foram incubados com as fatias, na presença ou ausência de apomorfina (100 µM) ou ritanserina (0,1 e 10 µM). **Resultados:** Alstonina e clozapina, mas não haloperidol, reduziram a captação de glutamato em fatias hipocámpais. Apomorfina aboliu os efeitos de clozapina (mas não de alstonina), enquanto ritanserina aboliu os efeitos de alstonina. Somente alstonina foi capaz de aumentar os níveis intracelulares de glutatona, e foi a única droga que não diminuiu a liberação de S100B. **Conclusão:** Esse estudo mostra que clozapina e alstonina diminuíram a captação de glutamato, o que podem ser benéfico à alegada patologia sináptica que afeta a transmissão glutamatérgica na esquizofrenia. Os resultados são compatíveis com o perfil comportamental de alstonina, notadamente a reversão do déficit de memória de trabalho induzido por MK-801. Uma vantagem adicional da alstonina é sua capacidade de aumentar os níveis de glutatona, um importante antioxidante que está diminuído no cérebro de esquizofrênicos. É necessário esclarecer (usando ligantes específicos) qual dos subtipos de receptor 5-HT<sub>2</sub> está envolvido nos efeitos de alstonina. Considerando que alstonina aumentou os níveis de glutatona e diminuiu a captação de glutamato, a hipótese de que o trocador cistina-glutamato esteja também envolvido pode ser verificado com inibidores específicos. Este trabalho ilustra a validade da etnofarmacologia na busca de novos compostos terapêuticos com mecanismo de ação inovador.

## ABSTRACT

**Relevance:** Schizophrenia is today understood as a group of psychoses characterized by altered thought, feelings and relating to the world. Among its symptoms a severely affected cognitive capacity is included, now part of the disease categorization. The glutamatergic hypothesis of schizophrenia is currently on focus given the accumulating evidence for the involvement of glutamatergic transmission in the neurobiological basis of the disease, as well as for its relevance in cognitive deficits thought to determine the poor quality of life of schizophrenic patients. It is believed that glutamate transporters' activity regulates the extracellular glutamate concentration and its spillover to extra-synaptic sites, therefore determining the activation of pre-, pos- and extra-synaptic receptors. In this context, changes in the "tripartite synapse" are expected to be potentially involved in various neurological and psychiatric disorders. Specifically for schizophrenia, it has been suggested that an increase in glutamate uptake could contribute to the glutamatergic hypofunction potentially implicated in the disease. Therefore, the modulation of glutamate transporters can be a target for the development of new antipsychotics. Alstonine was identified as the major component of an extract used by traditional psychiatrists in Nigeria to treat mentally ill patients. This alkaloid possesses a clear antipsychotic profile, closer to atypical than typical agents, in mice models relevant to schizophrenia. Its mechanism of action remains to be defined, but apparently it does not implicate dopaminergic receptors, whereas 5-HT<sub>2A/c</sub> serotonin receptors seem to be essential for its effects in mice models of positive, negative and cognitive symptoms. **Purpose:** As part of the continuing efforts to characterize alstonine as an antipsychotic drug, the purpose of this study focused on the analysis of alstonine's effects on neurochemical parameters relevant to schizophrenia pathophysiology. **Methods:** Acute hippocampal slices were used, incubated with haloperidol (10  $\mu$ M), clozapine (10 and 100  $\mu$ M) and the putative antipsychotic alstonine (1-100  $\mu$ M), alone or in combination with apomorphine (100  $\mu$ M) or ritanserin (0.1 and 10  $\mu$ M). Glutamate uptake, glutathione content and S100B secretion was assessed. **Results:** Alstonine and clozapine, but not haloperidol, reduced glutamate uptake in acute hippocampal slices. Apomorphine abolished the effect of clozapine (but not alstonine), whereas ritanserin abolished the effects of alstonine. Only alstonine was able to increase intracellular levels of glutathione, and was the only drug which did not decrease the release of S100B. **Conclusion:** This study shows that clozapine and the putative antipsychotic alstonine decreased glutamate uptake, which can be beneficial to the alleged synaptic pathology affecting glutamatergic transmission in schizophrenia. These results are compatible with the behavioral profile of alstonine, noteworthy the reversal of MK-801-induced working memory deficit, social withdrawal and hyperlocomotion. An additional advantage of alstonine is its capacity to increase the content of glutathione, an important cellular antioxidant shown to be decreased in the schizophrenic brain. It is necessary to elucidate (by using specific ligands) which of the serotonin 5-HT<sub>2</sub> receptor subtypes is involved in the effects of alstonine. Since alstonine increased glutathione levels and also decreased glutamate uptake, the hypothesis that the cystine-glutamate antiporter is implicated in its mechanism of action can be verified with specific inhibitors. This study illustrates the validity of ethnopharmacology in the search of therapeutically useful compounds with innovative mechanisms of action.

**LISTA DE ABREVIATURAS**

5-HT	5-hidróxi-triptamina
AMPA	ácido alfa-amino-3-hidróxi-5-metilisoaxazol-propiónico
AMPC	adenosina monofosfato cíclico
ATP	adenosina trifosfato
DAT	transportador de dopamina
EAAC	carreador de aminoácido excitatório
EAAT	transportador de aminoácido excitatório
GABA	ácido gama-amino-butírico
GLAST	transportador de glutamato e aspartato
GLT-1	transportador de glutamato 1
iGluR	receptor ionotrópico de glutamato
mGluR	receptor metabotrópico de glutamato
MK-801	dizocilpina
NET	transportador de noradrenalina
NMDA	N-metil-D-aspartato
PCP	fenciclidina
SERT	transportador de serotonina
VGLUT	transportador vesicular de glutamato
$x_c^-$	trocador cistina-glutamato

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Esquizofrenia

A esquizofrenia foi descrita pela primeira vez pelo psiquiatra Emil Kraepelin, em seu livro texto de 1893, como *dementia praecox* por causar um sério comprometimento cognitivo em pacientes relativamente jovens. Em 1911, Eugen Bleuler trocou o termo por esquizofrenia, que descreveu como um grupo de psicoses caracterizadas por alterações específicas de pensamento, sentimentos e relação com o mundo (Ban, 2004). Trata-se de um transtorno mental crônico e incapacitante, que geralmente surge na adolescência ou início da vida adulta. O diagnóstico é baseado na presença de sintomas específicos por um mínimo de seis meses, os quais podem incluir delírios, alucinações, discurso desorganizado, comportamento desorganizado ou catatônico, embotamento de emoções e prejuízo cognitivo (American Psychiatric Association, 2002).

Os principais sintomas da esquizofrenia foram classicamente divididos em positivos e negativos. Os sintomas positivos incluem alucinações (visuais e auditivas), delírios (geralmente do tipo paranoide) e distúrbios de pensamento; já os sintomas negativos abrangem emoções embotadas ou impróprias à situação, timidez excessiva e isolamento social, dentre outros. A capacidade cognitiva do esquizofrênico é severamente afetada, apresentando incoerências, desconexões e rigidez de raciocínio, déficits de memória de trabalho e função executiva, com forte repercussão na linguagem, aprendizado e memória, o que impede a integração e o funcionamento social adequado dos pacientes (Akdede et al., 2005; Schaub et al., 2010). Os sintomas cognitivos são extremamente incapacitantes e atualmente são incluídos na própria caracterização da doença (Bora et al., 2010).



A prevalência mundial da esquizofrenia ao longo da vida é comumente estimada em 1% da população, mas devido a divergências de metodologia e critérios de diagnóstico os dados são variáveis. Revisões sistemáticas encontraram números consideravelmente menores de 0,55% (Goldner et al., 2002) e 0,4% (Saha et al., 2005). Em um estudo mais recente (Perälä et al., 2007), a prevalência foi estimada em 0,87% da população. De qualquer forma, o custo social e econômico acarretado por esta doença é enorme, demonstrado pelo gasto estimado em mais de US\$ 60 bilhões nos Estados Unidos em 2002 (Wu et al., 2005).

Assim como câncer e diabetes, por exemplo, a esquizofrenia pertence a um grupo de doenças complexas, de etiologia multifatorial, sendo que a manifestação da doença é resultado de interações entre susceptibilidades genéticas e exposição a fatores ambientais. Quanto a fatores ambientais, estudos recentes mostraram que crescer em áreas urbanizadas, fazer parte de grupos minoritários, sofrer trauma na infância e consumir maconha na adolescência estão associados com quadros psicóticos (van Os et al., 2010). Os genes, por sua vez, exercem impacto por alterar a sensibilidade do indivíduo a fatores ambientais, resultando na criação de subgrupos mais vulneráveis a certos riscos como os citados acima. Apesar dos avanços na constatação destas associações, ainda não se sabe ao certo quais genes e fatores estão realmente implicados, ou como eles determinam o surgimento da doença.

A ideia de que a esquizofrenia fosse um transtorno demencial direcionou as pesquisas iniciais em busca de evidências para um processo neurodegenerativo. Entretanto, os primeiros estudos histológicos não observaram gliose, diferenciando os processos neuropatológicos envolvidos na esquizofrenia e nas demências senis (Rund, 2009). Alterações neuroanatômicas em estudos *post-mortem* foram relatadas, incluindo ventrículos aumentados e sulcos cerebrais proeminentes (Andreasen, 1994). Porém as dificuldades

metodológicas inerentes aos estudos de neuropatologia, os achados inconsistentes e o advento dos antipsicóticos na década de 1950 mudaram o foco das pesquisas para os neurotransmissores como elementos centrais para entender as bases neurobiológicas da doença. A partir de então surgiram as hipóteses neuroquímicas, relacionando os sintomas da esquizofrenia com alterações em circuitos de neurotransmissão.

### **1.1.1 Hipótese dopaminérgica**

A hipótese dopaminérgica dominou por muito tempo a pesquisa em esquizofrenia. Foi proposta a partir de dois conjuntos de observações: primeiro, a de que drogas que aumentam a atividade do sistema dopaminérgico, como a anfetamina, podem induzir quadros psicóticos em indivíduos sem patologia psiquiátrica prévia e precipitar crises em pacientes esquizofrênicos (Laruelle et al., 1996); segundo, a constatação de que os primeiros neurolépticos reduzem os sintomas psicóticos através do bloqueio de receptores dopaminérgicos (Carlsson e Lindqvist, 1963). A hipótese dopaminérgica clássica postula, assim, que a esquizofrenia estaria associada a um estado de hiperatividade dopaminérgica, principalmente na via mesolímbica, o que explicaria os sintomas positivos da doença. Estudos de neuroimagem em pacientes esquizofrênicos forneceram evidências mais diretas à ideia: liberação de dopamina induzida por anfetamina aumentada (Breier et al., 1997), *turnover* de dopamina aumentado no estriado (Abi-Dargham et al., 1998) e ocupação de receptores D<sub>2</sub> aumentada (Abi-Dargham et al., 2000). Essas e outras evidências apontam, no geral, para anormalidades dopaminérgicas pré-sinápticas, potencialmente associadas com disfunção no estoque de neurotransmissor, transporte vesicular, liberação, recaptação e metabolização da dopamina na via mesolímbica (Lyon et al., 2009).

Após o surgimento dos primeiros antipsicóticos, observou-se que o efeito terapêutico dos mesmos sobre sintomas negativos e cognitivos era insignificante. Além disso, estudos de neuroimagem relataram diminuição de receptores  $D_1$  no córtex pré-frontal de esquizofrênicos, o que foi correlacionado com sintomas negativos e baixo desempenho em testes cognitivos (Okubo et al., 1997; Abi-Dargham et al., 2002). Propôs-se, então, que uma hipofunção dopaminérgica no córtex pré-frontal seria responsável pelos sintomas negativos e cognitivos da esquizofrenia. A reformulação da teoria dopaminérgica clássica enuncia, portanto, que haveria um desequilíbrio cortical/subcortical na transmissão dopaminérgica: a hiperatividade das projeções dopaminérgicas para a via mesolímbica e a hiperestimulação de receptores  $D_2$  resultariam nos sintomas positivos, enquanto que as projeções dopaminérgicas mesocorticais estariam hipoativas e os receptores  $D_1$  hipoestimulados, levando aos sintomas negativos e ao comprometimento da cognição e sociabilidade observados em esquizofrênicos (Abi-Dargham, 2004).

### **1.1.2 Hipótese glutamatérgica**

Evidências quanto ao envolvimento do glutamato na neurobiologia da esquizofrenia surgiram com a publicação de um estudo mostrando que pacientes com esquizofrenia apresentavam níveis diminuídos de glutamato no líquido céfalo-raquidiano (Kim et al., 1980). Tal achado foi posteriormente reproduzido em alguns estudos (Bjerkstedt et al., 1985; Macciardi et al., 1990), mas não em outros (Gattaz et al., 1982; Perry et al., 1982; Korpi et al., 1987). Embora esse dado não tenha sido consistentemente replicado, ele originou a ideia de um déficit glutamatérgico na patofisiologia da esquizofrenia e iniciou uma série de estudos na área.

A hipótese glutamatérgica só ganhou maior impulso com as observações dos efeitos da fenciclidina (PCP), um antagonista de receptores NMDA. O PCP, ao contrário dos fármacos dopaminérgicos, induz em humanos (e modelos animais) tanto os sintomas positivos como os negativos e cognitivos da doença. Efeitos semelhantes foram observados para outros antagonistas de NMDA, como cetamina e MK-801. Outro aspecto importante da hipótese glutamatérgica é que em ratos a susceptibilidade ao bloqueio farmacológico de receptores NMDA surge somente a partir da puberdade e aumenta gradualmente até a idade adulta; um paralelo em humanos é o fato de que a cetamina, utilizada como anestésico, induz sintomas psicóticos em adultos, mas não em crianças, o que está de acordo com a história natural da doença cujo início é mais comum entre o final da adolescência e o início da fase adulta (Olney et al., 1999).

A existência de um déficit na função de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA e na transmissão glutamatérgica na esquizofrenia, não exclui, porém, o papel do sistema dopaminérgico na doença. As duas ideias são, na verdade, complementares, o que é compatível com as interações anatômicas e funcionais entre esses sistemas. Neurônios glutamatérgicos corticais controlam a atividade de neurônios dopaminérgicos da área tegmental ventral, diretamente ou via interneurônios GABAérgicos. Dessa forma, é possível que projeções glutamatérgicas provenientes do córtex modulem diferencialmente os circuitos dopaminérgicos: a via mesocortical é estimulada, enquanto que a via mesolímbica é inibida (Goff & Coyle, 2001). Entretanto, no caso de hipofunção glutamatérgica ocorre a desinibição dos neurônios dopaminérgicos que projetam para o estriado, perda de função do filtro talâmico e sobrecarga sensorial no córtex, o que poderia resultar nos sintomas positivos da esquizofrenia. Ao mesmo tempo, os neurônios dopaminérgicos da via

mesocortical com projeções para o córtex pré-frontal perdem seu estímulo excitatório, o que resultaria nos sintomas negativos e cognitivos (Stahl, 2008).

## 1.2 Neurotransmissão glutamatérgica

O aminoácido glutamato é reconhecido como o principal neurotransmissor excitatório no sistema nervoso central de mamíferos. Está envolvido em diversos processos fundamentais do sistema nervoso central, como cognição, memória e aprendizado, plasticidade sináptica, proliferação, migração, diferenciação, sobrevivência e morte celular (McDonald & Johnston, 1990; Izquierdo & Medina, 1997; Nedergaard et al., 2002). O glutamato é sintetizado no terminal pré-sináptico a partir da glutamina pela ação da enzima glutaminase, e é então captado pelas vesículas por transportadores vesiculares de glutamato (VGLUTs), que utilizam o gradiente de prótons vesicular mantido por uma  $H^+$ -ATPase (Tabb et al., 1992; Hisano, 2003).

Após liberado no espaço extracelular o glutamato exerce sua ação ao se ligar em receptores pré- ou pós-sinápticos. Esses receptores são classificados em duas categorias: ionotrópicos e metabotrópicos. Os receptores ionotrópicos (iGluRs) são canais que, quando ativados, permitem a passagem de um cátion específico, sendo classificados em NMDA, AMPA ou cainato (Ozawa et al., 1998). Os receptores NMDA possuem glicina como co-agonista, são altamente permeáveis a  $Ca^{2+}$  e são dependentes de voltagem. Em potenciais de repouso estão normalmente bloqueados por um íon  $Mg^{2+}$ , e a liberação do canal depende de despolarização da membrana (Edmonds et al., 1995). Os receptores AMPA, assim como os cainato, medeiam a transmissão sináptica excitatória rápida e são

independentes de voltagem, sendo permeáveis principalmente ao  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ , com baixa permeabilidade ao  $\text{Ca}^{2+}$  (Ozawa et al., 1998).

Os receptores glutamatérgicos metabotrópicos (mGluR), por sua vez, constituem um grupo de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs). O glutamato, ao ligar-se nesses receptores, ativa uma proteína G que pode ativar ou inibir a adenilato ciclase ou estimular a fosfolipase C, regulando assim a concentração de diferentes mediadores intracelulares (AMPc,  $\text{IP}_3$  ou  $\text{Ca}^{2+}$ ). Dentro desse grupo de receptores já foram caracterizados oito subtipos, os quais estão divididos em Grupo I (mGluR<sub>1,5</sub>), Grupo II (mGluR<sub>2,3</sub>) e Grupo III (mGluR<sub>4,6,7,8</sub>).

O glutamato liberado na fenda sináptica é removido do meio extracelular por transportadores de aminoácido excitatório (EAATs), que operam como um sistema de captação de alta afinidade que utiliza o gradiente transmembrana do  $\text{Na}^+$  como força motriz. Foram identificadas e clonadas cinco isoformas diferentes em neurônios e astrócitos: EAAT1/GLAST (Storck et al., 1992), EAAT2/GLT1 (Pines et al., 1992), EAAT3/EAAC1 (Kanai & Hediger, 1992), EAAT4 (Fairman et al., 1995) e EAAT5 (Arriza et al., 1997). GLAST e GLT1, transportadores glias, compartilham 65% de sua sequência de aminoácidos, sendo que GLAST é o principal transportador presente durante o desenvolvimento do sistema nervoso central (Furuta et al., 1997), enquanto o GLT1 é responsável por 90% de todo o transporte nos tecidos adultos (Tanaka et al., 1997). Esses dois transportadores são quantitativamente os principais transportadores de glutamato, responsáveis pela maior parte da sua remoção da fenda sináptica (Anderson & Swanson, 2000). Os demais transportadores estão localizados predominantemente em neurônios, sendo que EAAT4 é característico dos dendritos das células de Purkinje no cerebelo, e a expressão de EAAT5 é restrita a fotorreceptores e células de Müller na retina (Nedergaard et al., 2002).

É importante considerar que a atividade dos transportadores de glutamato regula também a difusão do neurotransmissor para sítios extra-sinápticos (*spillover*), e em última análise a ativação de receptores outros que não os pré- ou pós-sinápticos (Diamond, 2001; Huang et al., 2004). Nesse contexto, os mGluRs em geral concentram-se ao redor da densidade pós-sináptica, na periferia da junção sináptica (Baude et al., 1993; Luján et al., 1997), e em algumas sinapses receptores NMDA ocorrem somente extra-sinápticamente. A inibição dos transportadores potencializa as repostas mediadas por estes receptores, sugerindo que a regulação do transporte de glutamato possa regular a eficácia sináptica (Huang & Bergles, 2004). De fato, os EAATs, assim como os transportadores de noradrenalina (NET), dopamina (DAT) e serotonina (SERT), são regulados por diversas vias de sinalização. Proteínas cinases, fatores de crescimento e segundos mensageiros podem modular a expressão dos transportadores na superfície celular ou a sua atividade (Robinson, 2002; Shigeri et al., 2004).

Uma vez captado pelos astrócitos, o glutamato pode ser convertido a glutamina pela ação de uma enzima astrocítica dependente de ATP chamada glutamina sintetase (Norenberg & Martinez-Hernandez, 1979; Kvamme et al., 2000). A glutamina assim formada é liberada, captada pelos neurônios e hidrolisada pela enzima glutaminase, regenerando o glutamato que pode ser novamente estocado nas vesículas. Esse ciclo recebeu o nome de ciclo glutamato-glutamina, e destaca a importância da interação neurônio-glia (Bak et al., 2006; Kondziella et al., 2007). Entretanto, o glutamato nos astrócitos também apresenta outros destinos metabólicos, como síntese de peptídeos e proteínas, em especial a síntese de glutathione (Dringen & Hirrlinger, 2003). Além disso, as concentrações de glutamato intra- e extracelular podem ser reguladas por outro transportador astrocitário, o trocador cistina/glutamato independente de sódio, denominado sistema  $x_c^-$  (Bannai & Kitamura,

1980), que promove a entrada de cistina, que reduzida a cisteína é a precursora limitante para a síntese de glutatona, um dos principais sistemas antioxidantes do sistema nervoso central (Dringen, 2000; Had-Aissouni et al., 2002).

### **1.2.1 Interação neurônio-glia**

Até recentemente as células gliais eram consideradas apenas como suporte estrutural para os neurônios. Posteriormente, foi reconhecido seu papel dinâmico na manutenção e regulação do meio iônico extracelular, bem como no metabolismo de neurotransmissores, conforme descrito acima.

Nos últimos anos, porém, evidências têm demonstrado a existência de um sistema de comunicação bidirecional entre neurônios e células gliais, em especial os astrócitos. Esse modelo considera que o astrócito, juntamente com o terminal pré-sináptico e o neurônio pós-sináptico alvo, represente um terceiro elemento funcional da sinapse, caracterizando o que se denomina hoje de “sinapse tripartite”. Cabe ressaltar que neurônios e astrócitos estão organizados em duas redes estruturalmente distintas, mas estreitamente conectadas do ponto de vista funcional: a rede neural comunica-se através de sinapses, e a rede astrocítica é interconectada via junções *gap* (Rouach et al., 2004). O papel ativo da glia é evidenciado ainda pelo fato de que a liberação de neurotransmissores pelos neurônios pode ativar receptores expressos em astrócitos e desencadear sinalização através da propagação de ondas de cálcio (Fellin & Carmignoto, 2004; Perea & Araque, 2005). O astrócito estimulado, por sua vez, pode liberar o que se consideram hoje “gliotransmissores”: ATP, glutamato e D-serina, capazes de regular a excitabilidade neuronal e a transmissão sináptica (Perea et al., 2009; Araque & Navarrete, 2010).



Sabe-se hoje que alterações na interação entre neurônios e glia exercem um papel importante em diversas condições neurológicas e psiquiátricas (Cotter et al., 2001). Devido ao seu papel no metabolismo e na homeostase do glutamato, postula-se que a glia possa contribuir para a patofisiologia da esquizofrenia. De fato, diversos achados recentes têm fornecido evidências para essa hipótese.

### **1.3 Envolvimento da glia na esquizofrenia**

Historicamente, os trabalhos sobre alterações gliais em esquizofrenia focaram em confirmar a ausência de gliose, um marcador de processos inflamatórios e degenerativos. Os resultados de tais estudos favoreceram a hipótese desenvolvimental da esquizofrenia, já que um processo neurodegenerativo seria menos provável dado a ausência de gliose. Porém, mais tarde reconheceu-se que existe, na verdade, uma redução na densidade de células gliais e disfunção glial em esquizofrênicos (Uranova et al., 1996; Ongür et al., 1998; Johnston-Wilson et al., 2000; Cotter et al., 2001; Rajkowska et al., 2002; Webster et al., 2001, 2005). Nesse contexto, é interessante citar que um estudo realizado em macacos Rhesus tratados com antipsicóticos por seis meses mostrou aumento da densidade glial no córtex pré-frontal (Selemon et al., 1999).

Estudos recentes forneceram evidências de que a captação glial de glutamato estaria alterada em pacientes esquizofrênicos (Smith et al., 2001; McCullumsmith & Meador-Woodruff, 2002; Huerta et al., 2006; Bauer et al., 2008), e poderia contribuir para a disfunção da transmissão glutamatérgica na esquizofrenia. Matute et al. (2005) encontraram níveis aumentados de GLT1 (mRNA e proteína) em astrócitos do córtex pré-frontal de pacientes esquizofrênicos não tratados, e níveis normais ou reduzidos em pacientes tratados

com antipsicóticos. Outros estudos mostraram que o antipsicótico clozapina reduziu a expressão de GLT1 e a captação de glutamato em culturas de astrócitos (Vallejo-Illarramendi et al., 2005), bem como reduziu o transporte de glutamato no córtex pré-frontal de ratos (Melone et al., 2003). Tais resultados sugerem que um aumento da captação de glutamato poderia contribuir para o estado de hipofunção glutamatérgica potencialmente implicado na esquizofrenia, e ainda que o tratamento com antipsicóticos poderia melhorar a função glutamatérgica por ação no transporte desse neurotransmissor (Nanitsos et al., 2005; Kondziella et al., 2007).

Uma revisão da literatura sobre alterações gliais em esquizofrenia (Bernstein et al., 2009) mostrou que diversos estudos *post-mortem* encontraram alterações em genes relacionados a astrócitos, concluindo que o funcionamento anormal dos astrócitos poderia representar um fator causal importante na patologia sináptica, perturbando assim a transmissão dopaminérgica e glutamatérgica. Ainda, Katsel et al. (2011) examinaram os níveis de mRNA de proteínas marcadoras de astrócitos em diferentes camadas do giro cingulado anterior, uma região frequentemente associada com a esquizofrenia. Os pesquisadores encontraram diminuição em alguns marcadores nas camadas mais profundas dessa estrutura, sugerindo que uma subpopulação de astrócitos estaria comprometida na esquizofrenia, e levantando a possibilidade de uma disfunção glutamatérgica em populações neuronais específicas.

### **1.3.1 Proteína S100B**

A S100B é uma proteína ligante de cálcio de 21 kDa, membro de uma família de proteínas chamada S100 por serem solúveis em solução 100% de sulfato de amônio (Moore,

1965). No sistema nervoso central, a S100B é expressa e secretada principalmente por astrócitos (Donato, 2001), por um mecanismo ainda não esclarecido (Davey et al., 2001). A proteína S100B está envolvida na regulação do metabolismo energético, na proliferação e na diferenciação de neurônios e glia, além de interagir com diversas funções imunológicas do cérebro (Donato, 2003; Rothermundt et al., 2004). Ela age como um fator de crescimento dependente de concentração, afetando a sinaptogênese e a transmissão dopaminérgica e glutamatérgica (Tramontina et al., 2006; Rothermundt et al., 2007; Liu et al., 2008). Diversos estudos demonstraram que sua concentração no meio extracelular pode ser modulada por fatores como: ativação de receptores de adenosina A<sub>1</sub>, níveis elevados de glutamato, estimulação de receptores serotoninérgicos e aumento da concentração de cálcio intracelular (Cicarelli et al., 1999; Gonçalves et al., 2002; Whitaker-Azmitia et al., 1990; Davey et al., 2001). Estudos *in vitro* revelaram que a concentração de S100B presente no meio extracelular é determinante para seu efeito neurotrófico (concentrações na ordem de nanomolar) ou neurotóxico (concentrações na ordem de micromolar). Entre as funções tróficas propostas para a S100B estão a estimulação do crescimento de neuritos, proteção contra estresse oxidativo e o aumento da sobrevivência dos neurônios durante o desenvolvimento. Ao contrário, em níveis micromolares, a S100B é capaz de estimular a expressão de citocinas pró-inflamatórias e induzir a apoptose (Donato 2001; Van Eldik & Wainwright, 2003).

Desde o primeiro estudo relacionando esquizofrenia e níveis séricos aumentados de S100B (Wiesmann et al., 1999), uma série de trabalhos foi publicada no tema. Meta-análises recentes confirmaram esse primeiro achado, sendo o aumento mais consistente nos pacientes com crises agudas ou sintomas negativos predominantes (Schroeter et al., 2009; Schroeter & Steiner, 2009). Entretanto, ainda não está claro se os níveis aumentados de

S100B refletem exclusivamente uma característica patofisiológica da esquizofrenia, ou se o tratamento com antipsicóticos também pode influenciar as concentrações desse marcador. Resultados de experimentos *in vitro* são controversos: Steiner et al. (2010) observaram que os antipsicóticos clozapina e haloperidol diminuem a secreção de S100B em culturas de células C6 e OLN-93, enquanto Quincozes-Santos et al. (2008) mostraram que risperidona aumenta os níveis de S100B em culturas de C6, confirmado por Nardin et al. (2011).

#### **1.4 Antipsicóticos**

As drogas antipsicóticas utilizadas para tratar esquizofrenia exibem uma ampla variedade de propriedades farmacológicas, mas possuem em comum a capacidade de antagonizar receptores dopaminérgicos pós-sinápticos do tipo D<sub>2</sub>. Os antipsicóticos clássicos, ou de primeira geração, foram primeiramente referidos como neurolépticos por suprimirem movimentos espontâneos e comportamentos complexos, sem provocar perda da consciência, induzindo um estado de indiferença ao ambiente circundante. Fazem parte dessa categoria, por exemplo, haloperidol, clorpromazina, flufenazina, perfenazina e tiotixeno. Essas drogas apresentam pouco ou nenhum efeito no controle de sintomas negativos; de modo geral, não há melhora significativa das funções cognitivas e o uso crônico induz sintomas extrapiramidais (Keith et al., 2004), que eventualmente determinam a interrupção do tratamento. Já os antipsicóticos de segunda geração não exibem efeitos extrapiramidais e foram por isso denominados de antipsicóticos atípicos; exibem em geral um espectro maior de eficácia nos sintomas da doença, incluindo os sintomas negativos (Tandon & Jibson, 2003). São exemplos de agentes atípicos clozapina, olanzapina, risperidona, sulpirida, quetiapina e ziprasidona. Entre os efeitos adversos importantes

desses agentes mais novos incluem-se o significativo ganho de peso e alterações metabólicas.

O estudo *Clinical Antipsychotic Trials of Intervention Effectiveness* (CATIE) teve como objetivo comparar a eficácia de drogas antipsicóticas mais novas com agentes de primeira geração (Lieberman et al., 2005). O estudo foi delineado para comparar o antipsicótico de primeira geração perfenazina com os agentes atípicos olanzapina, quetiapina, ziprasidona e risperidona, em um ensaio duplo-cego. Parte da justificativa para a comparação tem cunho econômico, uma vez que os antipsicóticos atípicos podem custar até 10 vezes mais que os típicos. Surpreendentemente, a comparação não mostrou superioridade clara entre os agentes estudados. Em realidade, os resultados do estudo destacaram a variabilidade de resposta entre os pacientes em termos de eficácia e efeitos colaterais. O estudo concluiu pelo benefício de se apresentar aos pacientes múltiplas opções de tratamento, e propôs que a farmacoterapia deve ser ajustada aos pacientes de forma individualizada (Lieberman & Hsiao, 2006). O CATIE confirmou ainda a necessidade do desenvolvimento de tratamentos adicionais para a esquizofrenia, que sejam mais eficazes e toleráveis. De fato, apesar da disponibilidade de um grande número de agentes antipsicóticos, estima-se que 30% dos pacientes não respondem adequadamente ao tratamento (Meltzer, 1997). A clozapina é o fármaco mais eficaz em pacientes refratários, porém pode induzir agranulocitose, um efeito adverso potencialmente fatal que limita seu uso (Opgen-Rhein e Dettling, 1998).

#### **1.4.1 Alstonina**

A etnofarmacologia é uma disciplina interdisciplinar que visa a entender os sistemas médicos e o uso de medicamentos, em suas dimensões culturais e farmacológicas. Trata

particularmente do uso de plantas medicinais por quaisquer povos, em qualquer época ou lugar. O estudo da alstonina foi originado a partir de uma expedição etnofarmacológica da Shaman Pharmaceuticals à Nigéria, durante a qual o psiquiatra tradicional Chidi Osondu, da etnia igbo, foi visitado em sua clínica. Ele destacou o uso de uma planta medicinal chamada “uhuma obi-nwoke”, que significa “coração do homem” no idioma igbo, empregada para o tratamento de diferentes tipos de “loucura”. Dr. Chidi concedeu uma amostra de seu estoque do pó de planta seca para análise, da qual foi produzido um extrato bruto aquoso (SP49000), que testado em modelos animais mostrou propriedades antipsicóticas (Costa-Campos et al., 1999). Alstonina foi identificada como componente majoritário do extrato e revelou perfil claramente antipsicótico, mais próximo de atípicos que típicos, nas doses de 0,5 e 1 mg/kg, com curva dose-efeito na forma de U invertido em modelos animais relevantes a esquizofrenia (Costa-Campos et al., 1998).

A alstonina é um alcaloide indólico (3,4,5,6,16,17-hexadehidro-16-(metoxicarbonil)-19-alfa-metil-20-alfa-oxaioimbanium) presente em algumas espécies vegetais, das quais algumas são usadas como plantas medicinais. Na tentativa de esclarecer o mecanismo de ação da alstonina enquanto antipsicótico foram realizados ensaios de ligação (*binding*) com radioligantes, a fim de verificar possíveis interações da alstonina com os receptores D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub> (estriado) e 5-HT<sub>2A</sub> (córtex frontal). Curiosamente, alstonina não mostrou afinidade pelos receptores acima mencionados, diferindo assim do mecanismo de ação de todos os antipsicóticos disponíveis na época e sugerindo um mecanismo de ação inovador. Alstonina atenuou a hiperlocomoção induzida por MK-801 (Costa-Campos et al., 2004a), embora não haja indicação de atividade agonista direta já que alstonina não produz efeitos similares aos vistos com NMDA. Uma possibilidade é a modulação indireta do sistema glutamatérgico. Evidências para isso estão relacionadas ao fato de que a administração prévia de ritanserina,

um antagonista de receptores 5-HT<sub>2A/C</sub>, bloqueou os efeitos de alstonina em modelos animais de ansiedade, sintomas positivos (hiperlocomoção induzida por MK-801), sintomas negativos (déficit de interação social induzido por MK-801) e sintomas cognitivos (déficit de memória de trabalho induzido por MK-801), sugerindo também a modulação de receptores 5HT<sub>2A/C</sub> por alstonina. É ainda relevante considerar-se que antagonistas de receptores 5-HT<sub>2</sub> aumentam a transmissão glutamatérgica mediada por receptores NMDA (Breese et al., 2002; Xia, 2003).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Este trabalho teve por objetivo principal dar continuidade à caracterização de alstonina como fármaco antipsicótico, colaborando para a elucidação de seu mecanismo de ação.

### 2.2 Objetivos específicos

Visando a dar início ao estudo dos efeitos da alstonina na transmissão glutamatérgica, foi utilizado neste trabalho o modelo de fatias hipocâmpais agudas. Especificamente, avaliaram-se:

- 1) Os efeitos de alstonina, clozapina e haloperidol na captação de glutamato;
- 2) A influência da apomorfina, um agonista dopaminérgico não-seletivo, nos efeitos de alstonina, clozapina e haloperidol na captação de glutamato;
- 3) A influência da ritanserina, um antagonista de receptores 5-HT<sub>2A/C</sub>, no efeito de alstonina na captação de glutamato;
- 4) O efeito de alstonina, clozapina e haloperidol no conteúdo de glutatona;
- 5) O efeito de alstonina, clozapina e haloperidol na secreção da proteína S100B.



### **3 CAPÍTULO I**

#### **3.1 Effects of haloperidol, clozapine and the putative antipsychotic alstonine on glutamate uptake in acute hippocampal slices**

Artigo a ser submetido ao periódico *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*.

**Effects of haloperidol, clozapine and the putative antipsychotic alstonine on glutamate uptake in acute hippocampal slices**

Ana P. Herrmann<sup>a,b\*</sup>, Paula Lunardi<sup>b</sup>, Luísa Klaus Pilz<sup>a</sup>, Viviane M. Linck<sup>a,b</sup>, Christopher O. Okunji<sup>c</sup>, Carlos A. Gonçalves<sup>b</sup>, Elaine Elisabetsky<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Etnofarmacologia, Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rua Sarmiento Leite, 500, 90050-170, Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>b</sup> Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do sul. Rua Ramiro Barcelos, 2600, 90035-000, Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>c</sup> International Centre for Ethnomedicine and Drug Development (InterCEDD), Nsukka, Enugu State, Nigeria.

\*Corresponding author:

Ana Paula Herrmann

Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Rua Sarmiento Leite, 500, sala 202, 90050-170, Porto Alegre, RS, Brasil.

Phone/Fax: +55 51 33083121

E-mail address: [anaherrmann@gmail.com](mailto:anaherrmann@gmail.com)

## ABSTRACT

Cognitive deficits seem to determine the poor quality of life for schizophrenic patients and evidences suggests that cognitive and negative symptoms of schizophrenia result from a dysfunctional glutamatergic system. Modulating glutamate uptake has thus been suggested as a novel target for antipsychotics. The aim of this study was to evaluate the effects of antipsychotics (typical, atypical and putative) in glutamate uptake. Additionally, the effects of the antipsychotics on glutathione content and extracellular S100B levels were assessed. Acute hippocampal slices were used, incubated with haloperidol (10  $\mu$ M), clozapine (10 and 100  $\mu$ M) and the putative antipsychotic alstonine (1-100  $\mu$ M), alone or in combination with apomorphine (100  $\mu$ M) and ritanserin (0.1 and 10  $\mu$ M). Alstonine and clozapine, but not haloperidol, reduced glutamate uptake in acute hippocampal slices. Apomorphine abolished the effect of clozapine (but not alstonine), whereas ritanserin abolished the effects of alstonine. Only alstonine was able to increase intracellular levels of glutathione, and was the only drug which did not decrease the release of S100B. This study showed that clozapine and the putative antipsychotic alstonine decreased glutamate uptake, which can be beneficial to the alleged synaptic pathology affecting the glutamatergic transmission in schizophrenia. These results are compatible with the behavioral profile of alstonine, noteworthy the reversal of MK-801-induced working memory deficit. An additional advantage of alstonine is its capacity to increase glutathione levels, an important cellular antioxidant shown to be decreased in the schizophrenic brain.

**KEYWORDS:** alstonine, antipsychotics, schizophrenia, astrocytes, glutamate uptake, S100B.

## 1. Introduction

Schizophrenia is a severe psychiatric disorder marked by profound retreat from reality and incapacitating cognitive deficits, with lifetime prevalence commonly estimated in 1% of the population. It belongs to a group of complex multifactorial disorders, for which the etiology is understood as the intricate interaction between genetic and environmental factors (Gogos and Gerber, 2006; van Os, 2010).

The observations of the behavioral effects induced by phencyclidine (PCP), an antagonist of the NMDA type of glutamate receptors, prompted the idea of a glutamatergic dysfunction in the pathophysiology of schizophrenia. PCP, as well as the related drugs ketamine and MK-801, induce in normal volunteers psychosis and neurocognitive disturbances similar to those of schizophrenia, and unlike amphetamine they mimic all the symptoms dimensions of the disease (Javitt, 2010). It is now widely accepted that the dopaminergic alterations classically associated to schizophrenia may in fact be secondary to an underlying deficit in glutamatergic transmission (Carlsson, 2006; Marek et al., 2010).

Glutamate is released into the synapse and rapidly removed by a family of excitatory aminoacid transporters (EAATs) localized in neurons and glial cells. Five members of EAATs have been identified and termed EAAT1-5 to human homologs, or GLAST, GLT-1 and EAAC-1 representing the rodent homologs of EAATs 1-3, respectively (Kanai and Hediger, 1992; Pines et al., 1992; Storck et al., 1992; Fairman et al., 1995; Arriza et al., 1997). EAAT2/GLT-1 is predominantly expressed in astrocytes and provides more than 90% of total glutamate uptake in the central nervous system (Tanaka et al., 1997).

Given that astrocytes are fundamental in the control of glutamate homeostasis, a significant role has recently been assigned to glial-neuronal interactions in the

pathophysiology of schizophrenia. There is increasing evidence that structural and functional alterations in glial cells are present in the brain of schizophrenics (Cotter et al., 2001; Kondziella et al., 2006; Bernstein et al., 2009; Katsel et al., 2011). Additionally, a DNA array study showed that the genes most frequently altered in schizophrenia were related to glial function (Sugai et al., 2005). Signaling molecules such as the astrocytic protein S100B have also been examined in schizophrenia as markers of astrocytic function. Several studies reported increased S100B levels in the serum or cerebrospinal fluid (CSF) of schizophrenic patients (Wiesmann et al., 1999; Lara et al., 2001; Rothermundt et al., 2001; Schroeter et al., 2003; Rothermundt et al., 2004a; Rothermundt et al., 2004b; Schmitt et al., 2005; Rothermundt et al., 2007); however, the effects of antipsychotic drugs in this parameter remain unclear (Steiner et al., 2010).

It is undisputable that over the past decades major advances have been accomplished in the understanding of the neurobiological processes involved in schizophrenia. The acquired knowledge, however, has not translated into better treatment options, since all currently available antipsychotics share their mechanism of action with drugs discovered almost 60 years ago. Moreover, the modest and controversial benefits of antipsychotics on cognitive deficits and negative symptoms, combined with the unwanted side effects, result in high rates of treatment discontinuation (Lieberman et al., 2005). The development of drugs with a better profile and innovative mechanisms of action is thus required (Gründer et al., 2009).

We have previously reported the properties of alstonine, a putative antipsychotic which has consistently shown anxiolytic and antipsychotic-like effects in several mouse models (Costa-Campos et al., 1998; de Moura Linck et al., 2008). Alstonine is an indole alkaloid present in plant species traditionally used in Nigeria to treat mentally ill patients

(Costa-Campos et al., 1998). Although its mechanism of action remains unclear, D<sub>2</sub> receptors does not seem to be directly involved in its antipsychotic-like effects, and blockade of 5-HT<sub>2A/C</sub> receptors by ritanserin abolished its anxiolytic action (Costa-Campos et al., 2004a). Recent data showed that the ability of alstonine in counteracting MK-801-induced working memory deficit, social withdrawal and hyperlocomotion was also blocked by pretreatment with ritanserin (Linck et al., *in press*).

Considering the growing role attributed to astrocytes in brain signaling and the recognized association between glutamate dysfunction and schizophrenia, the aim of this study was to evaluate the effects of alstonine on glutamate uptake and other astrocytic parameters, and compare it to typical and atypical antipsychotics (haloperidol and clozapine, respectively). For this purpose we used acute hippocampal slices, suitable for our purposes for preserving the neuronal circuitry and the interactions between neurons and glia.

## **2. Materials and methods**

### *2.1. Animals*

Experiments were performed with 30-day-old male Wistar rats obtained from our breeding colony (Department of Biochemistry, UFRGS, Porto Alegre, Brazil). Animals were maintained under controlled environmental conditions (12-h light/dark cycle at a constant temperature of 22 ± 1 °C) with free access to food and water. The study was approved by the university ethics committee (approval #18237), and followed institutional policies on experimental animal handling.

## 2.2. Drugs and reagents

Alstonine hydrochloride was isolated from *Picralima nitida* Th. & H. Dur. (Apocynaceae) by Christopher O. Okunji as earlier described (Okunji et al., 2005). Clozapine was purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA), ritanserin and apomorphine from Research Biochemicals International (Natick, MA, USA), and haloperidol was used as commercial Haldol® from Janssen-Cilag Farmacêutica Ltda. (São Paulo, SP, Brazil). Monoclonal anti-S100B antibody (SHB1), 4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid (HEPES), *o*-phenylenediamine (OPD), 3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) and L-glutamate were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA), polyclonal rabbit anti-S100 from Dako (Glostrup, Denmark), and horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG and L-[2,3-<sup>3</sup>H]-glutamate from Amersham International (Buckinghamshire, UK). All other chemicals were purchased from local commercial suppliers.

## 2.3. Acute hippocampal slices

Rats were killed by decapitation. Hippocampi were removed and sliced in transverse sections of 0.3 mm using a McIlwain tissue chopper. Slices were transferred to 24-well plates containing 0.3 mL of HEPES-buffered saline solution (120 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM glucose and 25 mM HEPES, pH 7.4) per well. The medium was changed every 15 min for 2 h at room temperature. After this stabilization period the drugs were added and the slices incubated for 1 h at 30 °C. Treatments consisted of haloperidol (10 µM), clozapine (10 and 100 µM), alstonine (1, 10 and 100 µM), apomorphine (100 µM), and ritanserin (0.1 and 10 µM). Drug concentrations were chosen based on pilot

experiments or previous reports from the literature (Steiner, 2010; Nardin et al, 2011). All experiments were performed in triplicate.

#### *2.4. Glutamate uptake*

After the incubation period, the medium was replaced by Hank's balanced salt solution (HBSS) containing 137 mM NaCl, 0.63 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 4.17 mM NaOHCO<sub>3</sub>, 5.36 mM KCl, 0.44 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.26 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.41 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.49 mM MgCl<sub>2</sub> and 5.55 mM glucose, pH 7.4. The slices were maintained at 35 °C, and the assay was started by adding 0.1 mM L-glutamate and 0.66 µCi/mL L-[2,3-<sup>3</sup>H]-glutamate. Incubation was stopped after 5 min by removing the medium and rinsing the slices three times with ice-cold HBSS. Slices were then lysed in a solution containing 0.5 N NaOH. Sodium-independent (nonspecific) uptake was determined using a solution with N-methyl-D-glutamine instead of NaCl. Sodium-dependent glutamate uptake was obtained by subtracting nonspecific uptake. Radioactivity was measured with a scintillation counter (2800TR TriCarb Liquid Scintillation Analyzer, Perkin Elmer - Waltham, MA, USA). Final glutamate uptake was expressed as nmol/mg protein/min.

#### *2.5. Glutathione content*

Total glutathione content was determined as previously described (Browne and Armstrong, 1998). Briefly, slices were homogenized in sodium phosphate buffer (0.1 M, pH 8.0) containing 5 mM EDTA and protein was precipitated with 1.7% meta-phosphoric acid. Supernatant was assayed with *o*-phthaldialdehyde (1 mg/ml of methanol) at room temperature for 15 min. Fluorescence was measured using excitation and emission



wavelengths of 350 and 420 nm, respectively. A calibration curve was performed with standard glutathione solutions (0–500  $\mu\text{M}$ ). Final concentrations were calculated and expressed as nmol/mg protein.

#### *2.6. Extracellular S100B content*

Immediately after the incubation period, 10  $\mu\text{L}$  of medium were collected and kept in  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  until S100B levels were determined by ELISA as previously described (Leite et al., 2008). Briefly, 50  $\mu\text{L}$  of Tris buffer were added to the samples and incubated for 2 h in a microtiter plate previously coated with monoclonal anti-S100B. Polyclonal anti-S100 was incubated for 30 min; peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody was added for additional 30-min incubation. The color reaction with *o*-phenylenediamine was measured at 492 nm. The standard S100B curve ranged from 0.002 to 1 ng/mL. Results were expressed as a percentage of the control.

#### *2.7. Cell viability and integrity*

Cell viability was assayed by the colorimetric MTT reduction method (Hansen et al., 1989). Briefly, slices were incubated with 0.5 mg/mL of MTT at  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 30 min. The formazan product generated during the incubation was solubilized in dimethyl sulfoxide (DMSO). Absorbance values were measured at 560 and 630 nm. Cell integrity was indicated by lactate dehydrogenase (LDH) activity in the incubation medium. Determination was carried out by a colorimetric commercial kit (Doles Reagentes e Equipamentos para Laboratórios Ltda.,

Brazil) according to the manufacturer's instructions. Results were expressed as percentage of the control.

### *2.8. Protein content*

Total protein concentrations were determined by the modified method of Lowry (Peterson, 1977), using bovine serum albumin as standard.

### *2.9. Statistical analysis*

Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Newman-Keuls post hoc test. Two-way ANOVA was employed when analyzing the effects of two independent variables. GraphPad Prism 5 for Windows was used for the statistical analysis;  $p < 0.05$  was set as statistically significant. Results represent mean  $\pm$  S.E.M.

## **3. Results**

In order to verify if cell viability (Fig. 1A) and integrity (Fig. 1B) were not compromised by drug treatments two assays were performed in parallel. No significant differences were observed for MTT reduction ( $F_{6,53}=2.15$ ,  $p > 0.05$ ) or LDH activity ( $F_{6,56}=0.25$ ,  $p > 0.05$ ), indicating that slices remained viable and integrate. These same parameters were also evaluated for apomorphine and ritanserin, with no significant alterations (data not shown).

Glutamate uptake in hippocampal slices was significantly ( $F_{6,55}=8.63$ ,  $p < 0.0001$ ) altered by treatments (Fig. 2A). Post hoc analysis revealed that clozapine and alstonine

significantly decreased glutamate uptake at both 10 and 100  $\mu\text{M}$ . The co-incubation of the drugs with 100  $\mu\text{M}$  apomorphine, a dopaminergic agonist, also affected glutamate uptake ( $F_{7,50}=9.83$ ,  $p<0.0001$ ), as shown in Fig. 2B. Post hoc analysis indicated that apomorphine had no effects *per se*, and did not interfere with alstonine-induced decrease in glutamate uptake; interestingly, however, the decrease in glutamate uptake induced by clozapine at 100  $\mu\text{M}$  was abolished in the presence of apomorphine.

We additionally investigated whether a low concentration of ritanserin, inactive in glutamate uptake, altered the decrease induced by 100  $\mu\text{M}$  alstonine (Fig. 3A). Two-way ANOVA revealed a main effect of alstonine ( $F_{1,30}=17.23$ ,  $p<0.001$ ) and of ritanserin ( $F_{1,30}=7.4$ ,  $p<0.05$ ), as well as an interaction effect of alstonine x ritanserin ( $F_{1,30}=10.53$ ,  $p<0.01$ ). These results showed that alstonine's effect on glutamate uptake is prevented by a low concentration of ritanserin. Fig. 3B shows the effect of a higher concentration of ritanserin on alstonine's action. Two-way ANOVA revealed a main effect of alstonine ( $F_{1,30}=44.24$ ,  $p<0.0001$ ) and of ritanserin ( $F_{1,30}=37.47$ ,  $p<0.0001$ ), but no interaction effect of alstonine x ritanserin ( $F_{1,30}=2.11$ ,  $p>0.5$ ). Post hoc analysis indicated that not only both ritanserin and alstonine significantly decreased glutamate uptake, but also that the decrease was significantly greater when both drugs were combined.

Total glutathione content was significantly altered in hippocampal slices submitted to drug treatments ( $F_{6,50}=3.76$ ,  $p<0.01$ ), as shown in Fig. 4. Post hoc analysis indicated that only alstonine in its highest concentration (100  $\mu\text{M}$ ) was able to increase glutathione levels compared to control.

As shown at Fig. 5, treatment with antipsychotic drugs significantly altered S100B secretion levels ( $F_{6,133}=3.15$ ,  $p<0.01$ ). Post hoc analysis revealed that haloperidol at 10  $\mu\text{M}$  and clozapine at 100, but not 10  $\mu\text{M}$ , reduced the secretion of this protein.

#### 4. Discussion

In the present study we show the effects of known antipsychotics and the alkaloid alstonine in biochemical parameters relevant to the pathophysiological basis of schizophrenia. One significant finding is the observation that alstonine and clozapine, but not haloperidol, reduce glutamate uptake in acute hippocampal slices. It is now accepted that it is the glutamate transport that determines the availability of released glutamate to pre- and post-synaptic receptors, as well as its spillover to extra-synaptic sites (Diamond, 2001; Huang and Bergles, 2004; Huang et al., 2004; Dunlop, 2006). Several studies have documented altered expression and function of astrocytic glutamate transporters in schizophrenia (Ohnuma et al., 1998; Ohnuma et al., 2000; Smith et al., 2001; Matute et al., 2005). It has been suggested that an increased glutamate uptake by astrocytes may considerably contribute to the glutamatergic hypofunction in schizophrenia (Nanitsos et al., 2005). Reducing glutamate uptake can thus be regarded as a viable strategy to improve glutamatergic function, and is compatible with the ability of alstonine and clozapine to counteract MK-801-induced behavioral effects. In agreement with our findings, it has been reported that clozapine reduced both the expression of glutamate transporters and the glutamate uptake in astrocyte cultures (Vallejo-Illarramendi et al., 2005), as well as glutamate transport in rat prefrontal cortex (Melone et al., 2003). On the contrary, selective D<sub>2</sub> receptor antagonists such as haloperidol were shown to be less effective than atypical antipsychotics to attenuate the effects induced by NMDA receptor antagonists (Meltzer et al., 2011), in agreement with haloperidol inactivity in glutamate uptake.

We additionally observed that when apomorphine, a non-selective dopamine agonist, was co-incubated with the antipsychotic drugs the effect of clozapine at 100 (but

not 10)  $\mu\text{M}$  on glutamate uptake was abolished. Interestingly, this suggests that at this higher concentration the effects of clozapine on glutamate uptake are dependent on dopamine receptors; indeed, clozapine is more likely to bind to dopamine receptors at higher concentrations (Brunton et al., 2010). Alstonine's effects on glutamate uptake were not altered by co-incubation with apomorphine, as expected by its lack of affinity for dopamine receptors (Costa-Campos et al., 1998). Although reducing glutamate uptake can be advantageous to minimize glutamate hypofunction and is suggested as a novel target for antipsychotics (Nanitsos et al., 2005), it is well established that excessive glutamate availability may overactivate NMDA and AMPA receptors leading to excitotoxicity. In the case of alstonine, the glutamatergic modulation through reduced uptake does not seem to reach excitotoxic levels, since we previously reported that alstonine, unlike clozapine, lacks proconvulsant properties (Costa-Campos et al., 2004b). We suggest that alstonine may reestablish appropriate levels of neuronal excitability in areas relevant to the pathophysiology of schizophrenia, without concomitant overstimulation that results in seizures as commonly seen with clozapine in 2-10% of patients (Devinsky et al., 1991; Liukkonen et al., 1992; Günther et al., 1993; Pacia and Devinsky, 1994; Wilson & Claussen, 1994; Sajatovic and Meltzer, 1996; Stevens et al., 1996; Knott et al., 2001; Centorrino et al., 2002; Hedges et al., 2003; Alper et al., 2007).

Alstonine-induced decrease in glutamate uptake was prevented by ritanserin (a 5-HT<sub>2A/C</sub> antagonist), in agreement with the behavioral data (Linck et al., *in press*). A growing body of evidence suggests that 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>2C</sub> serotonin receptors exert opposing neurochemical and behavioral effects (Martin et al., 1997; Fletcher et al., 2002; Winstanley et al., 2004; Fletcher et al., 2007; Robinson et al., 2008; Halberstadt et al., 2009; Fantegrossi et al., 2010; Scarlota et al., 2011). Relevant to this context, the release of dopamine is

enhanced by 5-HT<sub>2A</sub> activation, whereas 5-HT<sub>2C</sub> receptors appear to inhibit it (Millan et al., 1998; Di Matteo et al., 2001; Bortolozzi et al., 2005; Di Giovanni et al., 2006; Pehek et al., 2006; Huang et al., 2011). It is arguable therefore that the effect of antagonism at 5-HT<sub>2C</sub> receptors exerted by ritanserin could counteract the effect of antagonism at 5-HT<sub>2A</sub> receptors, and that the results obtained with low and high concentrations of ritanserin on glutamate uptake can be explained by its differential antagonism at different concentrations. The low concentration, which did not decrease glutamate uptake *per se*, blocked alstonine-induced decrease, further suggesting that the effects of alstonine are mediated by 5-HT<sub>2A/C</sub> receptors. The high concentration of ritanserin, however, decreased glutamate uptake similarly to alstonine; when both drugs were combined an additive effect was observed.

Schizophrenia has been consistently associated with reduced levels of glutathione, leading to potential dysfunction of NMDA receptors (Do et al., 2000; Steullet et al., 2006; Yao et al., 2006; Gysin et al., 2007; Matsuzawa et al., 2008; Raffa et al., 2009; Gawryluk et al., 2011; Micó et al., 2011). Glutathione is a tripeptide consisting of glycine, cysteine and glutamate, which participates in essential aspects of cellular homeostasis. The cellular ability to synthesize glutathione is an important factor in the management of oxidative stress-induced neurotoxicity. Importantly, elevated levels of extracellular glutamate may inhibit cystine transport, mainly by the astrocytic cystine-glutamate antiporter ( $x_c^-$  system), impairing glutathione synthesis and cellular capacity to buffer reactive oxygen species (Had-Aissouni et al., 2002). The results show that among the antipsychotics studied only alstonine was able to increase intracellular levels of glutathione in hippocampal slices; this may represent an additional valuable feature of alstonine. It is tempting to speculate that alstonine could interfere with the  $x_c^-$  system, though specific experiments are required to

elucidate this possibility and/or clarify the precise mechanism by which alstonine increases glutathione.

S100B is a calcium-binding protein secreted by astrocytes into the synapse, where it is thought to participate in synaptic plasticity (Nishiyama et al., 2005), being neurotrophic at nanomolar and apoptotic at micromolar levels (Ahlemeyer et al., 2000; Kögel et al., 2004). Increased serum and CSF S100B levels in schizophrenic patients have been interpreted as a marker of structural damage, or alternatively as a sign of increased astrocyte activation (Wiesmann et al., 1999). It has been previously suggested that antipsychotic drugs could normalize these elevated levels (Ling et al., 2007; Steiner et al., 2009; Steiner et al., 2010; Nardin et al., 2011). Corroborating this idea, we here show that both the typical antipsychotic haloperidol and the atypical clozapine decreased the release of S100B in hippocampal slices, consistent with results obtained by Steiner et al. (2010) in C6 and OLN-93 cell cultures. In contrast, alstonine did not alter S100B levels, differing again from clozapine, as in the above mentioned parameters.

## **5. Conclusions**

Cognitive deficits are now recognized as the core symptom of schizophrenia, determinant for social impairment and lack of long-term quality of life for schizophrenic patients. A growing body of evidence suggests that, particularly cognitive and negative symptoms result from a dysfunctional glutamate system, with consequences in the dopaminergic, serotonergic and GABAergic systems.

We here show that clozapine and the putative antipsychotic alstonine decreased glutamate uptake, which can be beneficial to the alleged synaptic pathology affecting

glutamate neurons in schizophrenia. The data is compatible with alstonine ability to reverse MK-801-induced behavioral changes, noteworthy working memory deficit. An additional advantage of alstonine is its capacity to increase the content of glutathione, an important cellular antioxidant shown to be decreased in the schizophrenic brain.

## References

Ahlemeyer, B., Beier, H., Semkova, I., Schaper, C., Krieglstein, J., 2000. S-100beta protects cultured neurons against glutamate- and staurosporine-induced damage and is involved in the antiapoptotic action of the 5 HT(1A)-receptor agonist, Bay x 3702. *Brain Res.* 858, 121-8.

Alper, K., Schwartz, K.A., Kolts, R.L., Khan, A., 2007. Seizure incidence in psychopharmacological clinical trials: an analysis of Food and Drug Administration (FDA) summary basis of approval reports. *Biol Psychiatry.* 62, 345-54.

Arriza, J.L., Eliasof, S., Kavanaugh, M.P., Amara, S.G., 1997. Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94, 4155-60.

Bernstein, H.G., Steiner, J., Bogerts, B., 2009. Glial cells in schizophrenia: pathophysiological significance and possible consequences for therapy. *Expert Rev Neurother.* 9, 1059-71.



Bortolozzi, A., Díaz-Mataix, L., Scorza, M.C., Celada, P., Artigas, F., 2005. The activation of 5-HT receptors in prefrontal cortex enhances dopaminergic activity. *J Neurochem.* 95, 1597-607.

Browne, R.W., Armstrong, D., 1998. Reduced glutathione and glutathione disulfide. *Methods Mol Biol.* 108, 347-52.

Brunton, L.L., Chabner, B.A., Knollmann, B.C., 2011. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, twelfth ed. McGraw-Hill, New York.

Carlsson, A., 2006. The neurochemical circuitry of schizophrenia. *Pharmacopsychiatry.* 39 Suppl 1, S10-4.

Centorrino, F., Price, B.H., Tuttle, M., Bahk, W.M., Hennen, J., Albert, M.J., Baldessarini, R.J., 2002. EEG abnormalities during treatment with typical and atypical antipsychotics. *Am J Psychiatry.* 159, 109-15.

Costa-Campos, L., Lara, D.R., Nunes, D.S., Elisabetsky, E., 1998. Antipsychotic-like profile of alstonine. *Pharmacol Biochem Behav.* 60, 133-41.

Costa-Campos, L., Dassoler, S., Rigo, A., Iwu, M., Elisabetsky, E., 2004a. Anxiolytic properties of the antipsychotic alkaloid alstonine. *Pharmacol Biochem Behav.* 77, 481-9.

Costa-Campos, L., Iwu, M., Elisabetsky, E., 2004b. Lack of pro-convulsant activity of the antipsychotic alkaloid alstonine. *J Ethnopharmacol.* 93, 307-10.

Cotter, D.R., Pariante, C.M., Everall, I.P., 2001. Glial cell abnormalities in major psychiatric disorders: the evidence and implications. *Brain Res Bull.* 55, 585-95.

de Moura Linck, V., Herrmann, A., Goerck, G., Iwu, M., Okunji, C., Leal, M., Elisabetsky, E., 2008. The putative antipsychotic alstonine reverses social interaction withdrawal in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 32, 1449-52.

Devinsky, O., Honigfeld, G., Patin, J., 1991. Clozapine-related seizures. *Neurology.* 41, 369-71.

Di Giovanni, G., Di Matteo, V., Pierucci, M., Benigno, A., Esposito, E., 2006. Serotonin involvement in the basal ganglia pathophysiology: could the 5-HT<sub>2C</sub> receptor be a new target for therapeutic strategies? *Curr Med Chem.* 13, 3069-81.

Di Matteo, V., De Blasi, A., Di Giulio, C., Esposito, E., 2001. Role of 5-HT<sub>2C</sub> receptors in the control of central dopamine function. *Trends Pharmacol Sci.* 22, 229-32.

Diamond, J.S., 2001. Neuronal glutamate transporters limit activation of NMDA receptors by neurotransmitter spillover on CA1 pyramidal cells. *J Neurosci.* 21, 8328-38.

Do, K.Q., Trabesinger, A.H., Kirsten-Krüger, M., Lauer, C.J., Dydak, U., Hell, D., Holsboer, F., Boesiger, P., Cuénod, M., 2000. Schizophrenia: glutathione deficit in cerebrospinal fluid and prefrontal cortex in vivo. *Eur J Neurosci.* 12, 3721-8.

Dunlop, J., Marquis, K.L., Lim, H.K., Leung, L., Kao, J., Cheesman, C., Rosenzweig-Lipson, S., 2006. Pharmacological profile of the 5-HT(2C) receptor agonist WAY-163909; therapeutic potential in multiple indications. *CNS Drug Rev.* 12, 167-77.

Fairman, W.A., Vandenberg, R.J., Arriza, J.L., Kavanaugh, M.P., Amara, S.G., 1995. An excitatory amino-acid transporter with properties of a ligand-gated chloride channel. *Nature.* 375, 599-603.

Fantegrossi, W.E., Simoneau, J., Cohen, M.S., Zimmerman, S.M., Henson, C.M., Rice, K.C., Woods, J.H., 2010. Interaction of 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>2C</sub> receptors in R(-)-2,5-dimethoxy-4-iodoamphetamine-elicited head twitch behavior in mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 335, 728-34.

Fletcher, P.J., Grottick, A.J., Higgins, G.A., 2002. Differential effects of the 5-HT(2A) receptor antagonist M100907 and the 5-HT(2C) receptor antagonist SB242084 on cocaine-induced locomotor activity, cocaine self-administration and cocaine-induced reinstatement of responding. *Neuropsychopharmacology.* 27, 576-86.

Fletcher, P.J., Tampakeras, M., Sinyard, J., Higgins, G.A., 2007. Opposing effects of 5-HT(2A) and 5-HT(2C) receptor antagonists in the rat and mouse on premature responding in the five-choice serial reaction time test. *Psychopharmacology (Berl).* 195, 223-34.

Gawryluk, J.W., Wang, J.F., Andreatza, A.C., Shao, L., Young, L.T., 2011. Decreased levels of glutathione, the major brain antioxidant, in post-mortem prefrontal cortex from patients with psychiatric disorders. *Int J Neuropsychopharmacol.* 14, 123-30.

Gogos, J.A., Gerber, D.J., 2006. Schizophrenia susceptibility genes: emergence of positional candidates and future directions. *Trends Pharmacol Sci.* 27, 226-33.

Gründer, G., Hippus, H., Carlsson, A., 2009. The 'atypicality' of antipsychotics: a concept re-examined and re-defined. *Nat Rev Drug Discov.* 8, 197-202.

Gysin, R., Kraftsik, R., Sandell, J., Bovet, P., Chappuis, C., Conus, P., Deppen, P., Preisig, M., Ruiz, V., Steullet, P., Tosic, M., Werge, T., Cuénod, M., Do, K.Q., 2007. Impaired glutathione synthesis in schizophrenia: convergent genetic and functional evidence. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104, 16621-6.

Günther, W., Baghai, T., Naber, D., Spatz, R., Hippus, H., 1993. EEG alterations and seizures during treatment with clozapine. A retrospective study of 283 patients. *Pharmacopsychiatry.* 26, 69-74.

Had-Aissouni, L., Ré, D.B., Nieoullon, A., Kerkerian-Le Goff, L., 2002. Importance of astrocytic inactivation of synaptically released glutamate for cell survival in the central nervous system-are astrocytes vulnerable to low intracellular glutamate concentrations? *J Physiol Paris.* 96, 317-22.

Halberstadt, A.L., van der Heijden, I., Ruderman, M.A., Risbrough, V.B., Gingrich, J.A., Geyer, M.A., Powell, S.B., 2009. 5-HT(2A) and 5-HT(2C) receptors exert opposing effects on locomotor activity in mice. *Neuropsychopharmacology*. 34, 1958-67.

Hansen, M.B., Nielsen, S.E., Berg, K., 1989. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J Immunol Methods*. 119, 203-10.

Hedges, D., Jeppson, K., Whitehead, P., 2003. Antipsychotic medication and seizures: a review. *Drugs Today (Barc)*. 39, 551-7.

Huang, M., Dai, J., Meltzer, H.Y., 2011. 5-HT(2A) and 5-HT(2C) receptor stimulation are differentially involved in the cortical dopamine efflux-Studied in 5-HT(2A) and 5-HT(2C) genetic mutant mice. *Eur J Pharmacol*. 652, 40-5.

Huang, Y.H., Sinha, S.R., Tanaka, K., Rothstein, J.D., Bergles, D.E., 2004. Astrocyte glutamate transporters regulate metabotropic glutamate receptor-mediated excitation of hippocampal interneurons. *J Neurosci*. 24, 4551-9.

Javitt, D.C., 2010. Glutamatergic theories of schizophrenia. *Isr J Psychiatry Relat Sci*. 47, 4-16.

Kanai, Y., Hediger, M.A., 1992. Primary structure and functional characterization of a high-affinity glutamate transporter. *Nature*. 360, 467-71.

Katsel, P., Byne, W., Roussos, P., Tan, W., Siever, L., Haroutunian, V., 2011. Astrocyte and glutamate markers in the superficial, deep, and white matter layers of the anterior cingulate gyrus in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*. 36, 1171-7.

Knott, V., Labelle, A., Jones, B., Mahoney, C., 2001. Quantitative EEG in schizophrenia and in response to acute and chronic clozapine treatment. *Schizophr Res*. 50, 41-53.

Kondziella, D., Brenner, E., Eyjolfsson, E.M., Markinhuhta, K.R., Carlsson, M.L., Sonnewald, U., 2006. Glial-neuronal interactions are impaired in the schizophrenia model of repeated MK801 exposure. *Neuropsychopharmacology*. 31, 1880-7.

Kögel, D., Peters, M., König, H.G., Hashemi, S.M., Bui, N.T., Arolt, V., Rothermundt, M., Prehn, J.H., 2004. S100B potently activates p65/c-Rel transcriptional complexes in hippocampal neurons: Clinical implications for the role of S100B in excitotoxic brain injury. *Neuroscience*. 127, 913-20.

Lara, D.R., Gama, C.S., Belmonte-de-Abreu, P., Portela, L.V., Gonçalves, C.A., Fonseca, M., Hauck, S., Souza, D.O., 2001. Increased serum S100B protein in schizophrenia: a study in medication-free patients. *J Psychiatr Res*. 35, 11-4.

Leite, M.C., Galland, F., Brolese, G., Guerra, M.C., Bortolotto, J.W., Freitas, R., Almeida, L.M., Gottfried, C., Gonçalves, C.A., 2008. A simple, sensitive and widely applicable ELISA for S100B: Methodological features of the measurement of this glial protein. *J Neurosci Methods*. 169, 93-9.

Lieberman, J., Stroup, T., McEvoy, J., Swartz, M., Rosenheck, R., Perkins, D., Keefe, R., Davis, S., Davis, C., Lebowitz, B., Severe, J., Hsiao, J., Investigators, C.A.T.o.I.E.C., 2005. Effectiveness of antipsychotic drugs in patients with chronic schizophrenia. *N Engl J Med.* 353, 1209-23.

Linck, V.M., Bessa, M.M., Herrmann, A.P., Iwu, M., Okunji, C.O., Elisabetsky, E., *in press*. 5HT<sub>2A/C</sub> receptors mediate the antipsychotic-like effects of the putative antipsychotic alstonine. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*.

Linck, V.M., Herrmann, A.P., Piato, A.L., Detanico, B.C., Figueiró, M., Flório, J., Iwu, M., Okunji, C.O., Leal, M.B., Elisabetsky, E., 2011. Alstonine as an Antipsychotic: Effects on Brain Amines and Metabolic Changes. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2011, 1-7.

Ling, S.H., Tang, Y.L., Jiang, F., Wiste, A., Guo, S.S., Weng, Y.Z., Yang, T.S., 2007. Plasma S-100B protein in Chinese patients with schizophrenia: comparison with healthy controls and effect of antipsychotics treatment. *J Psychiatr Res.* 41, 36-42.

Liukkonen, J., Koponen, H.J., Nousiainen, U., 1992. Clinical picture and long-term course of epileptic seizures that occur during clozapine treatment. *Psychiatry Res.* 44, 107-12.

Marek, G.J., Behl, B., Beshpalov, A.Y., Gross, G., Lee, Y., Schoemaker, H., 2010. Glutamatergic (N-methyl-D-aspartate receptor) hypofrontality in schizophrenia: too little juice or a miswired brain? *Mol Pharmacol.* 77, 317-26.

Martin, P., Waters, N., Carlsson, A., Carlsson, M.L., 1997. The apparent antipsychotic action of the 5-HT<sub>2a</sub> receptor antagonist M100907 in a mouse model of schizophrenia is counteracted by ritanserin. *J Neural Transm.* 104, 561-4.

Matsuzawa, D., Obata, T., Shirayama, Y., Nonaka, H., Kanazawa, Y., Yoshitome, E., Takanashi, J., Matsuda, T., Shimizu, E., Ikehira, H., Iyo, M., Hashimoto, K., 2008. Negative correlation between brain glutathione level and negative symptoms in schizophrenia: a 3T 1H-MRS study. *PLoS One.* 3, e1944.

Matute, C., Melone, M., Vallejo-Illarramendi, A., Conti, F., 2005. Increased expression of the astrocytic glutamate transporter GLT-1 in the prefrontal cortex of schizophrenics. *Glia.* 49, 451-5.

Melone, M., Bragina, L., Conti, F., 2003. Clozapine-induced reduction of glutamate transport in the frontal cortex is not mediated by GLAST and EAAC1. *Mol Psychiatry.* 8, 12-3.

Meltzer, H.Y., Horiguchi, M., Massey, B.W., 2011. The role of serotonin in the NMDA receptor antagonist models of psychosis and cognitive impairment. *Psychopharmacology (Berl).* 213, 289-305.

Micó, J.A., Rojas-Corrales, M.O., Gibert-Rahola, J., Parellada, M., Moreno, D., Fraguas, D., Graell, M., Gil, J., Irazusta, J., Castro-Fornieles, J., Soutullo, C., Arango, C., Otero, S., Navarro, A., Baeza, I., Martínez-Cengotitabengoa, M., González-Pinto, A., 2011. Reduced antioxidant defense in early onset first-episode psychosis: a case-control study. *BMC Psychiatry.* 11, 26.



Millan, M.J., Dekeyne, A., Gobert, A., 1998. Serotonin (5-HT)<sub>2C</sub> receptors tonically inhibit dopamine (DA) and noradrenaline (NA), but not 5-HT, release in the frontal cortex in vivo. *Neuropharmacology*. 37, 953-5.

Nanitsos, E.K., Nguyen, K.T., St'astný, F., Balcar, V.J., 2005. Glutamatergic hypothesis of schizophrenia: involvement of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-dependent glutamate transport. *J Biomed Sci*. 12, 975-84.

Nardin, P., Tramontina, A.C., Quincozes-Santos, A., Tortorelli, L.S., Lunardi, P., Klein, P.R., Wartchow, K.M., Bobermin, L.D., Gottfried, C., Elisabetsky, E., Gonçalves, C.A., 2011. In vitro S100B secretion is reduced by apomorphine: effects of antipsychotics and antioxidants. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 35, 1291-6.

Nishiyama, H., Knopfel, T., Endo, S., Itohara, S., 2002. Glial protein S100B modulates long-term neuronal synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99, 4037-42.

Ohnuma, T., Augood, S.J., Arai, H., McKenna, P.J., Emson, P.C., 1998. Expression of the human excitatory amino acid transporter 2 and metabotropic glutamate receptors 3 and 5 in the prefrontal cortex from normal individuals and patients with schizophrenia. *Brain Res Mol Brain Res*. 56, 207-17.

Ohnuma, T., Tessler, S., Arai, H., Faull, R.L., McKenna, P.J., Emson, P.C., 2000. Gene expression of metabotropic glutamate receptor 5 and excitatory amino acid transporter 2 in the schizophrenic hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res*. 85, 24-31.

Okunji, C.O., Iwu, M.M., Ito, Y., 2005. Preparative separation of indole alkaloids from the rind of *Picralima nitida* (Stapf) T. Durand & H. Durand by pH-Zone-refining countercurrent chromatography. *J Liq Chromatog Rel Technol.* 28, 775-83.

Pacia, S.V., Devin sky, O., 1994. Clozapine-related seizures: experience with 5,629 patients. *Neurology.* 44, 2247-9.

Pehek, E.A., Nocjar, C., Roth, B.L., Byrd, T.A., Mabrouk, O.S., 2006. Evidence for the preferential involvement of 5-HT<sub>2A</sub> serotonin receptors in stress- and drug-induced dopamine release in the rat medial prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology.* 31, 265-77.

Peterson, G.L., 1977. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem.* 83, 346-56.

Pines, G., Danbolt, N.C., Bjørås, M., Zhang, Y., Bendahan, A., Eide, L., Koepsell, H., Storm-Mathisen, J., Seeberg, E., Kanner, B.I., 1992. Cloning and expression of a rat brain L-glutamate transporter. *Nature.* 360, 464-7.

Raffa, M., Mechri, A., Othman, L.B., Fendri, C., Gaha, L., Kerkeni, A., 2009. Decreased glutathione levels and antioxidant enzyme activities in untreated and treated schizophrenic patients. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 33, 1178-83.

Robinson, E.S., Dalley, J.W., Theobald, D.E., Glennon, J.C., Pezze, M.A., Murphy, E.R., Robbins, T.W., 2008. Opposing roles for 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>2C</sub> receptors in the nucleus accumbens on inhibitory response control in the 5-choice serial reaction time task. *Neuropsychopharmacology*. 33, 2398-406.

Rothermundt, M., Missler, U., Arolt, V., Peters, M., Leadbeater, J., Wiesmann, M., Rudolf, S., Wandinger, K.P., Kirchner, H., 2001. Increased S100B blood levels in unmedicated and treated schizophrenic patients are correlated with negative symptomatology. *Mol Psychiatry*. 6, 445-9.

Rothermundt, M., Falkai, P., Ponath, G., Abel, S., Bürkle, H., Diedrich, M., Hetzel, G., Peters, M., Siegmund, A., Pedersen, A., Maier, W., Schramm, J., Suslow, T., Ohrmann, P., Arolt, V., 2004a. Glial cell dysfunction in schizophrenia indicated by increased S100B in the CSF. *Mol Psychiatry*. 9, 897-9.

Rothermundt, M., Ponath, G., Glaser, T., Hetzel, G., Arolt, V., 2004b. S100B serum levels and long-term improvement of negative symptoms in patients with schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*. 29, 1004-11.

Rothermundt, M., Ohrmann, P., Abel, S., Siegmund, A., Pedersen, A., Ponath, G., Suslow, T., Peters, M., Kaestner, F., Heindel, W., Arolt, V., Pfeleiderer, B., 2007. Glial cell activation in a subgroup of patients with schizophrenia indicated by increased S100B serum concentrations and elevated myo-inositol. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 31, 361-4.

Sajatovic, M., Meltzer, H.Y., 1996. Clozapine-induced myoclonus and generalized seizures. *Biol Psychiatry*. 39, 367-70.

Scarlota, L.C., Harvey, J.A., Aloyo, V.J., 2011. The role of serotonin-2 (5-HT<sub>2</sub>) and dopamine receptors in the behavioral actions of the 5-HT<sub>2A/2C</sub> agonist, DOI, and putative 5-HT<sub>2C</sub> inverse agonist, SR46349B. *Psychopharmacology (Berl)*. 213, 393-401.

Schmitt, A., Bertsch, T., Henning, U., Tost, H., Klimke, A., Henn, F.A., Falkai, P., 2005. Increased serum S100B in elderly, chronic schizophrenic patients: negative correlation with deficit symptoms. *Schizophr Res*. 80, 305-13.

Schroeter, M.L., Abdul-Khaliq, H., Frühauf, S., Höhne, R., Schick, G., Diefenbacher, A., Blasig, I.E., 2003. Serum S100B is increased during early treatment with antipsychotics and in deficit schizophrenia. *Schizophr Res*. 62, 231-6.

Smith, R.E., Haroutunian, V., Davis, K.L., Meador-Woodruff, J.H., 2001. Expression of excitatory amino acid transporter transcripts in the thalamus of subjects with schizophrenia. *Am J Psychiatry*. 158, 1393-9.

Steiner, J., Walter, M., Wunderlich, M.T., Bernstein, H.G., Panteli, B., Brauner, M., Jacobs, R., Gos, T., Rothermundt, M., Bogerts, B., 2009. A new pathophysiological aspect of S100B in schizophrenia: potential regulation of S100B by its scavenger soluble RAGE. *Biol Psychiatry*. 65, 1107-10.

Steiner, J., Schroeter, M.L., Schiltz, K., Bernstein, H.G., Müller, U.J., Richter-Landsberg, C., Müller, W.E., Walter, M., Gos, T., Bogerts, B., Keilhoff, G., 2010. Haloperidol and clozapine decrease S100B release from glial cells. *Neuroscience*. 167, 1025-31.

Steullet, P., Neijt, H.C., Cuénod, M., Do, K.Q., 2006. Synaptic plasticity impairment and hypofunction of NMDA receptors induced by glutathione deficit: relevance to schizophrenia. *Neuroscience*. 137, 807-19.

Stevens, J.R., Denney, D., Szot, P., 1996. Kindling with clozapine: behavioral and molecular consequences. *Epilepsy Res*. 26, 295-304.

Storck, T., Schulte, S., Hofmann, K., Stoffel, W., 1992. Structure, expression, and functional analysis of a Na(+)-dependent glutamate/aspartate transporter from rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89, 10955-9.

Sugai, T., Kawamura, M., Iritani, S., Araki, K., Makifuchi, T., Imai, C., Nakamura, R., Kakita, A., Takahashi, H., Nawa, H., 2004. Prefrontal abnormality of schizophrenia revealed by DNA microarray: impact on glial and neurotrophic gene expression. *Ann N Y Acad Sci*. 1025, 84-91.

Tanaka, K., Watase, K., Manabe, T., Yamada, K., Watanabe, M., Takahashi, K., Iwama, H., Nishikawa, T., Ichihara, N., Kikuchi, T., Okuyama, S., Kawashima, N., Hori, S., Takimoto, M., Wada, K., 1997. Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. *Science*. 276, 1699-702.

Vallejo-Illarramendi, A., Torres-Ramos, M., Melone, M., Conti, F., Matute, C., 2005. Clozapine reduces GLT-1 expression and glutamate uptake in astrocyte cultures. *Glia*. 50, 276-9.

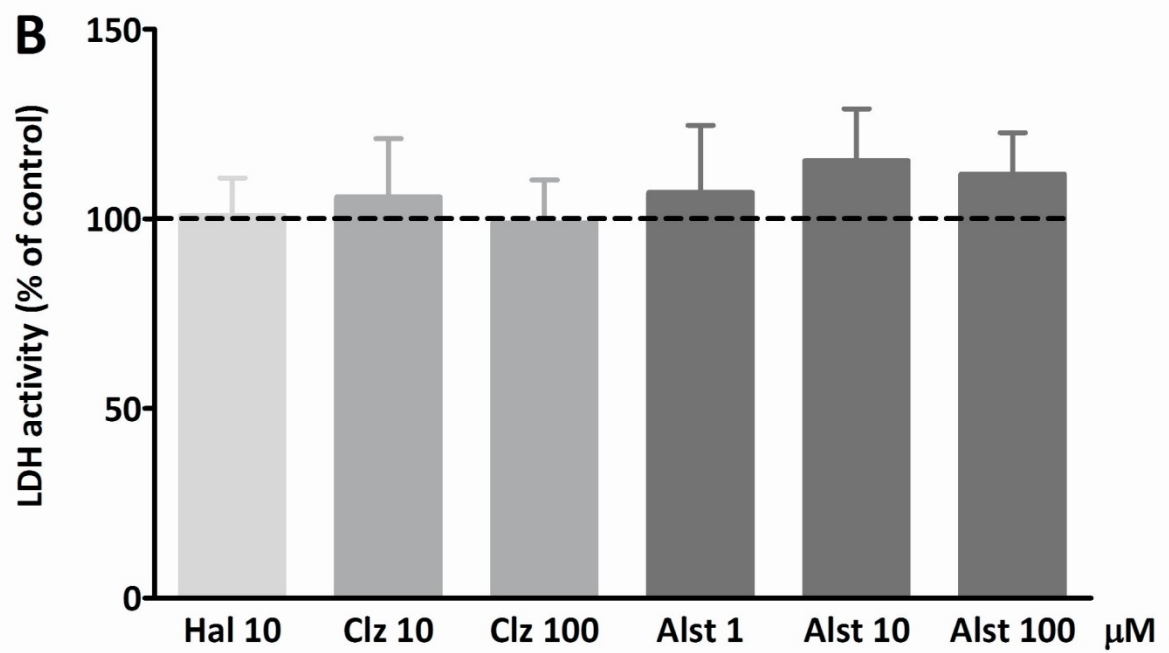
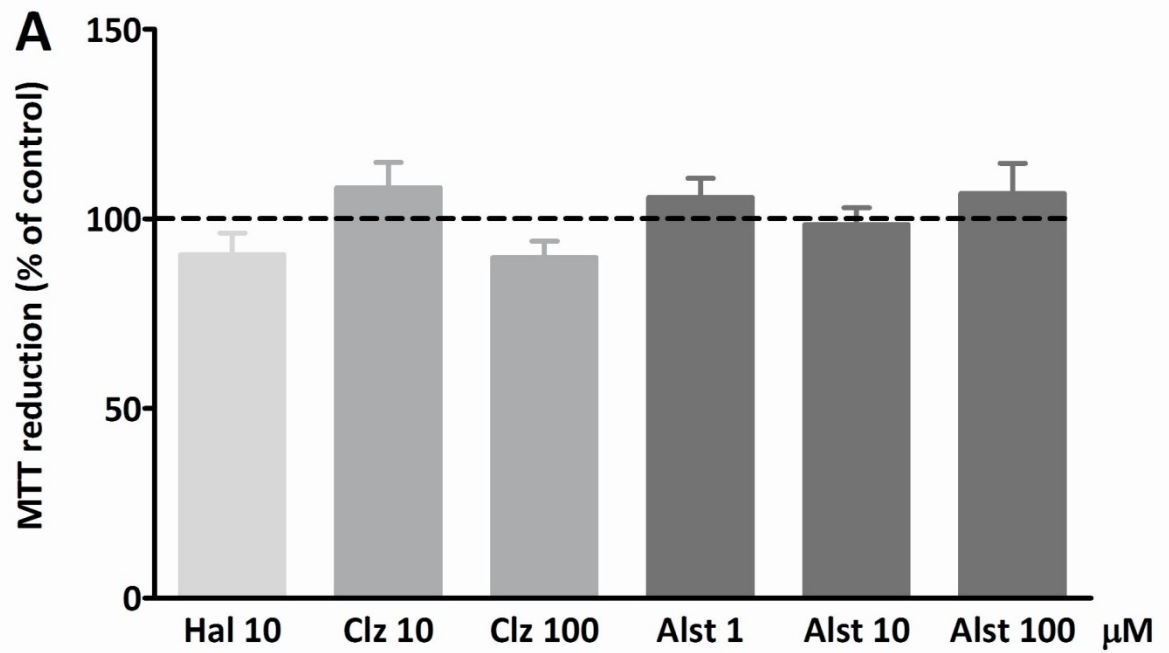
van Os, J., Kenis, G., Rutten, B.P., 2010. The environment and schizophrenia. *Nature*. 468, 203-12.

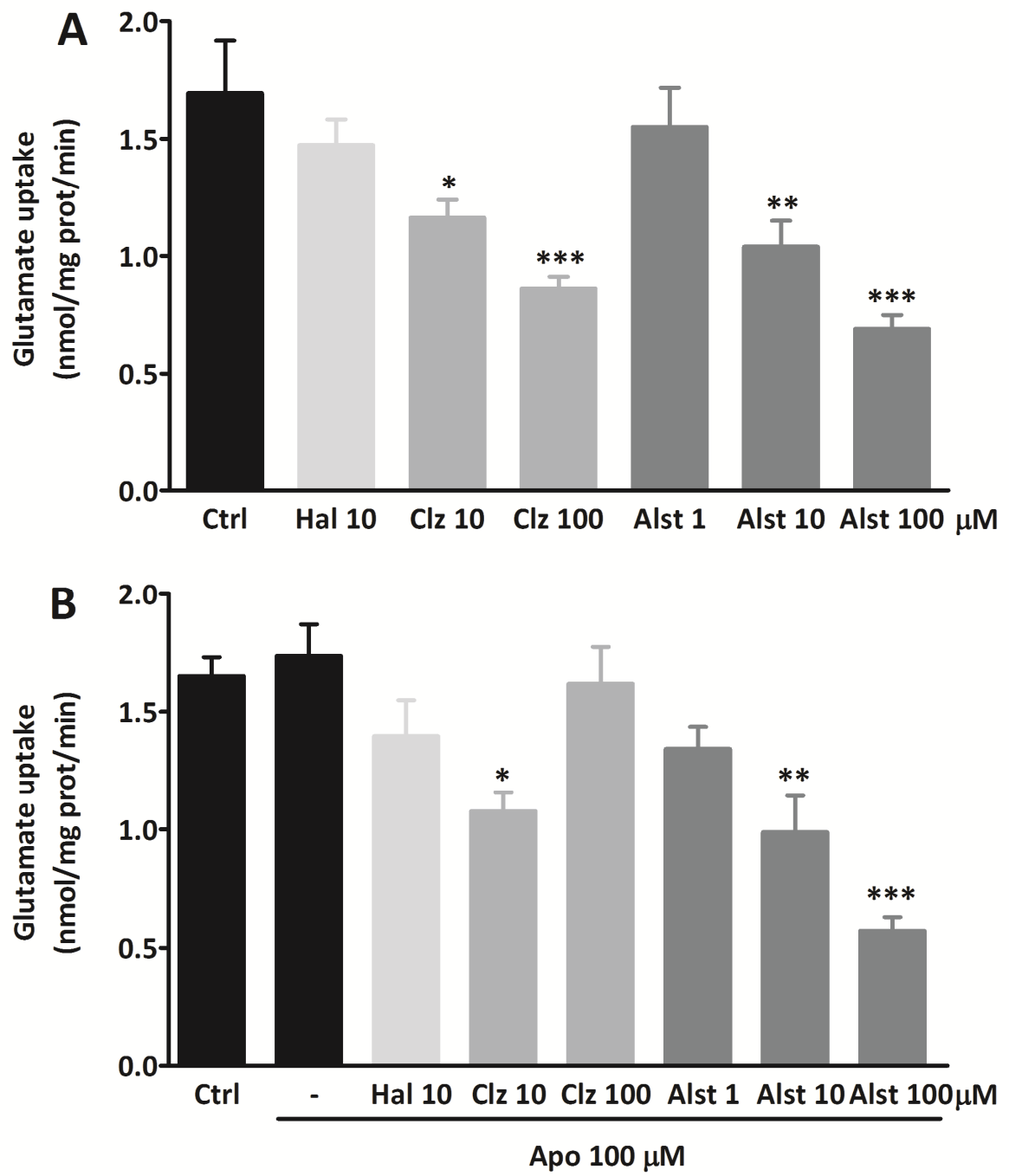
Wiesmann, M., Wandinger, K.P., Missler, U., Eckhoff, D., Rothermundt, M., Arolt, V., Kirchner, H., 1999. Elevated plasma levels of S-100b protein in schizophrenic patients. *Biol Psychiatry*. 45, 1508-11.

Wilson, W.H., Claussen, A.M., 1994. Seizures associated with clozapine treatment in a state hospital. *J Clin Psychiatry*. 55, 184-8.

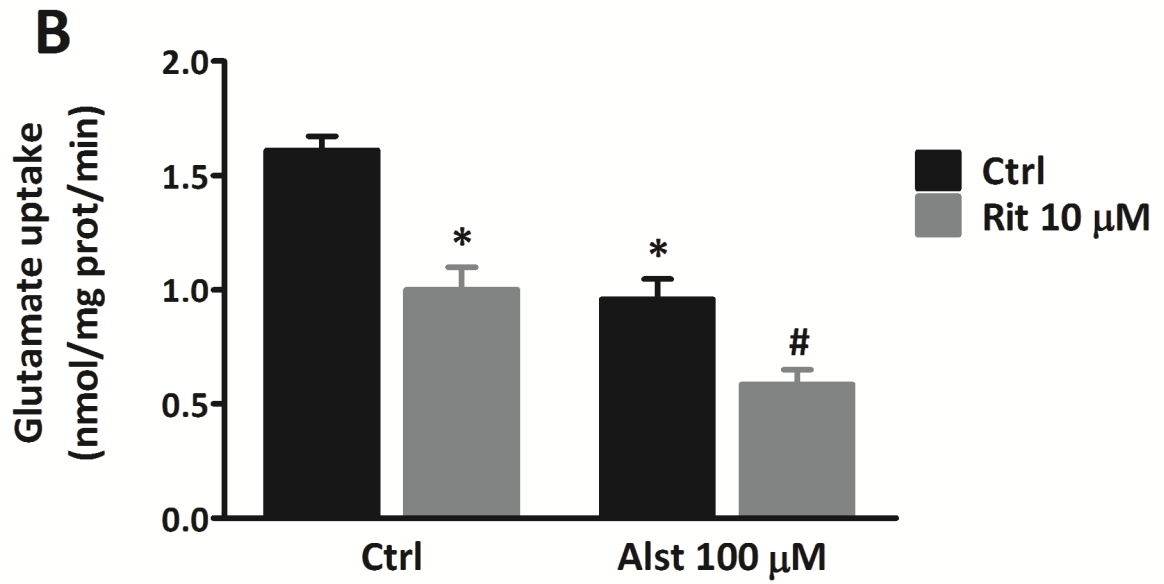
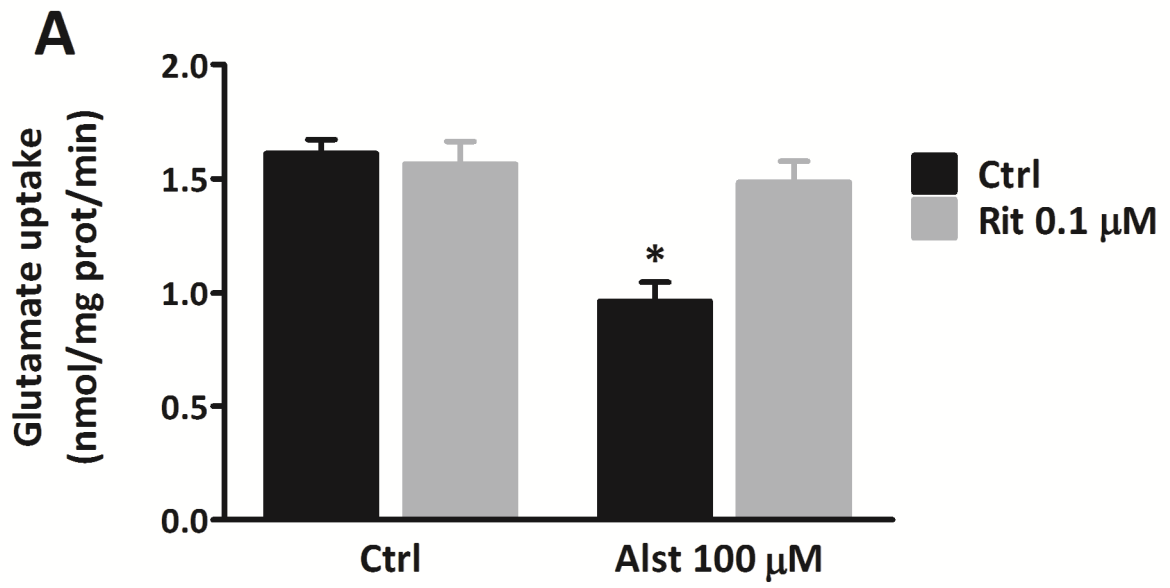
Winstanley, C.A., Theobald, D.E., Dalley, J.W., Glennon, J.C., Robbins, T.W., 2004. 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>2C</sub> receptor antagonists have opposing effects on a measure of impulsivity: interactions with global 5-HT depletion. *Psychopharmacology (Berl)*. 176, 376-85.

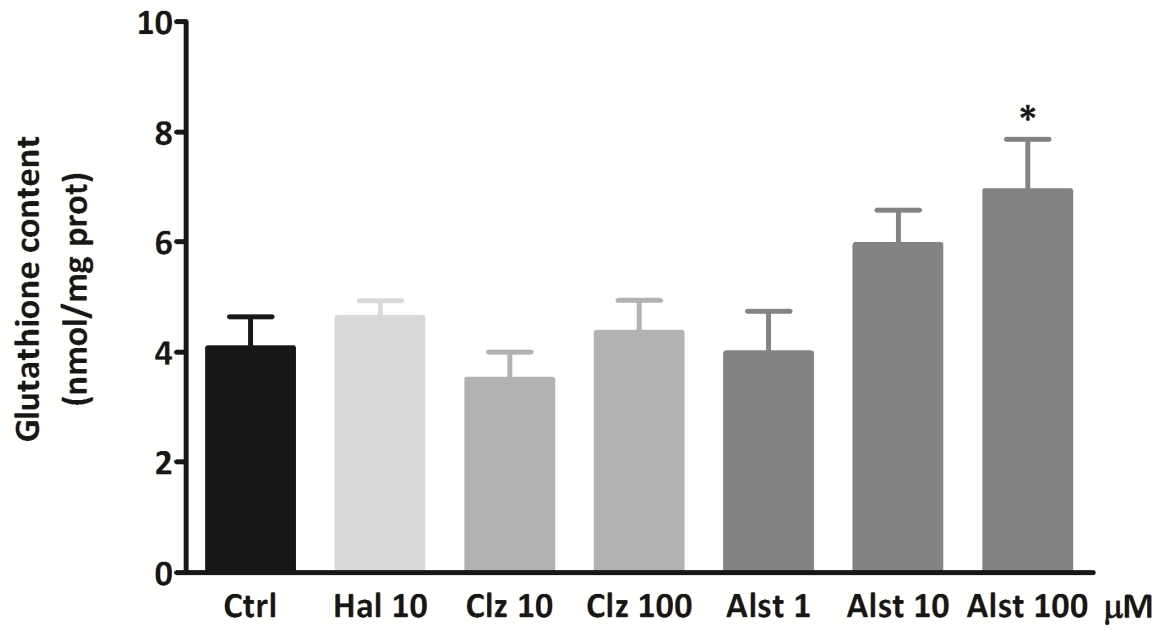
Yao, J.K., Leonard, S., Reddy, R., 2006. Altered glutathione redox state in schizophrenia. *Dis Markers*. 22, 83-93.

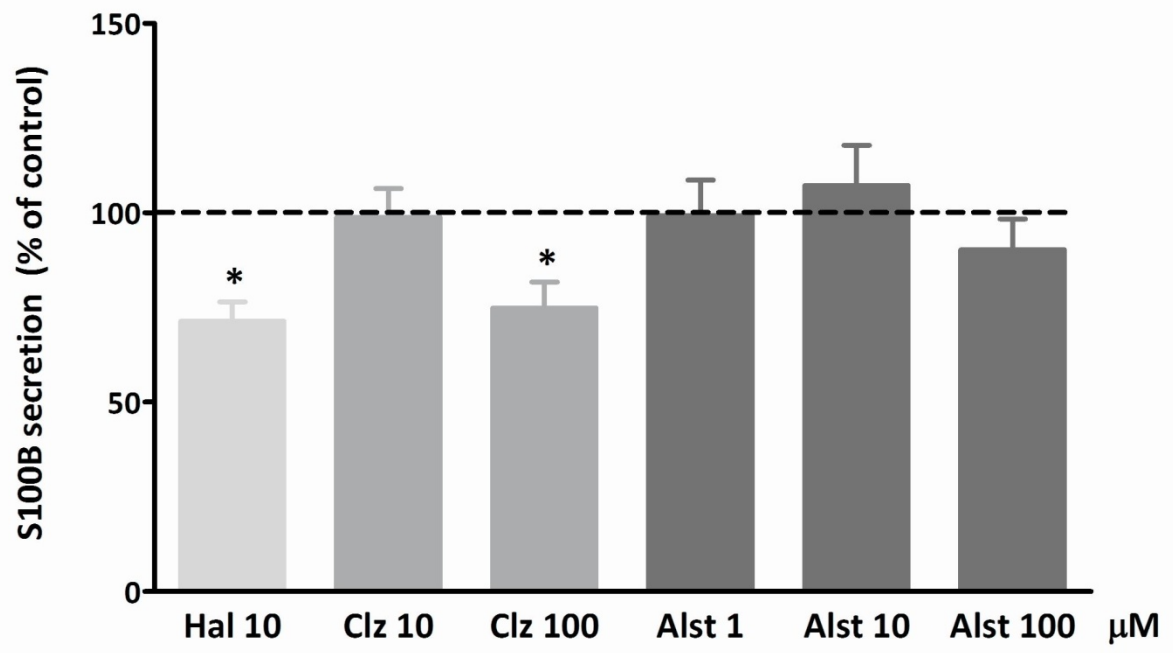












**Fig. 1.** Effects of haloperidol (Hal), clozapine (Clz) and alstonine (Alst) on cell viability and integrity. Hippocampal slices were incubated for 1 h with the various drugs at the indicated concentrations. (A) MTT reduction to formazan. (B) Activity of lactate dehydrogenase released into the medium. Data represent mean  $\pm$  S.E.M and are expressed as percentage of control value. One-way ANOVA.

**Fig. 2.** Effects of haloperidol (Hal), clozapine (Clz), alstonine (Alst) and apomorphine (Apo) on glutamate uptake in hippocampal slices. (A) Glutamate uptake after incubation with the drugs *per se*. (B) Glutamate uptake after co-incubation of drugs and apomorphine. Data represent mean  $\pm$  S.E.M and are expressed as nmol/mg protein/min. \*= $p < 0.05$ , \*\*= $p < 0.01$ , \*\*\*= $p < 0.001$  compared to control. One-way ANOVA/Newman-Keuls.

**Fig. 3.** Effects of ritanserin (Rit) on alstonine-induced decrease in glutamate uptake. (A) Glutamate uptake after co-incubation with a low (A) and a high (B) concentration of ritanserin. Data represent mean  $\pm$  S.E.M and are expressed as nmol/mg protein/min. \*= $p < 0.01$  compared to control; #= $p < 0.01$  compared to all other groups. Two-way ANOVA/Newman-Keuls.

**Fig. 4.** Effects of haloperidol (Hal), clozapine (Clz) and alstonine (Alst) on glutathione content. Hippocampal slices were incubated for 1 h with the drugs and total glutathione content was measured. Data represent mean  $\pm$  S.E.M and are expressed as nmol/mg protein. \*= $p < 0.05$  compared to control. One-way ANOVA/Newman-Keuls.

**Fig. 5.** Effects of haloperidol, clozapine and alstonine on S100B secretion. Hippocampal slices were incubated for 1 h with the drugs and S100B levels in the medium were measured. Data represent mean  $\pm$  S.E.M and are expressed as percentage of control.  $*=p<0.05$  compared to control. One-way ANOVA/Newman-Keuls.

#### 4 DISCUSSÃO E PERSPECTIVAS

Os déficits cognitivos têm sido descritos como características centrais da esquizofrenia, e estão estreitamente relacionados com o prejuízo do funcionamento social dos pacientes. Entretanto, o efeito terapêutico dos antipsicóticos disponíveis em relação a sintomas negativos e déficits cognitivos é reconhecidamente limitado (Buchanan et al., 2007). Foi através de uma expedição etnofarmacológica à Nigéria que se identificou o potencial antipsicótico de uma preparação utilizada por psiquiatras tradicionais, da qual a alstonina foi identificada como o componente majoritário. Estudos anteriores mostraram que a alstonina apresenta um claro perfil antipsicótico em modelos experimentais, mais próximo de atípicos que de típicos, além de apresentar atividade ansiolítica.

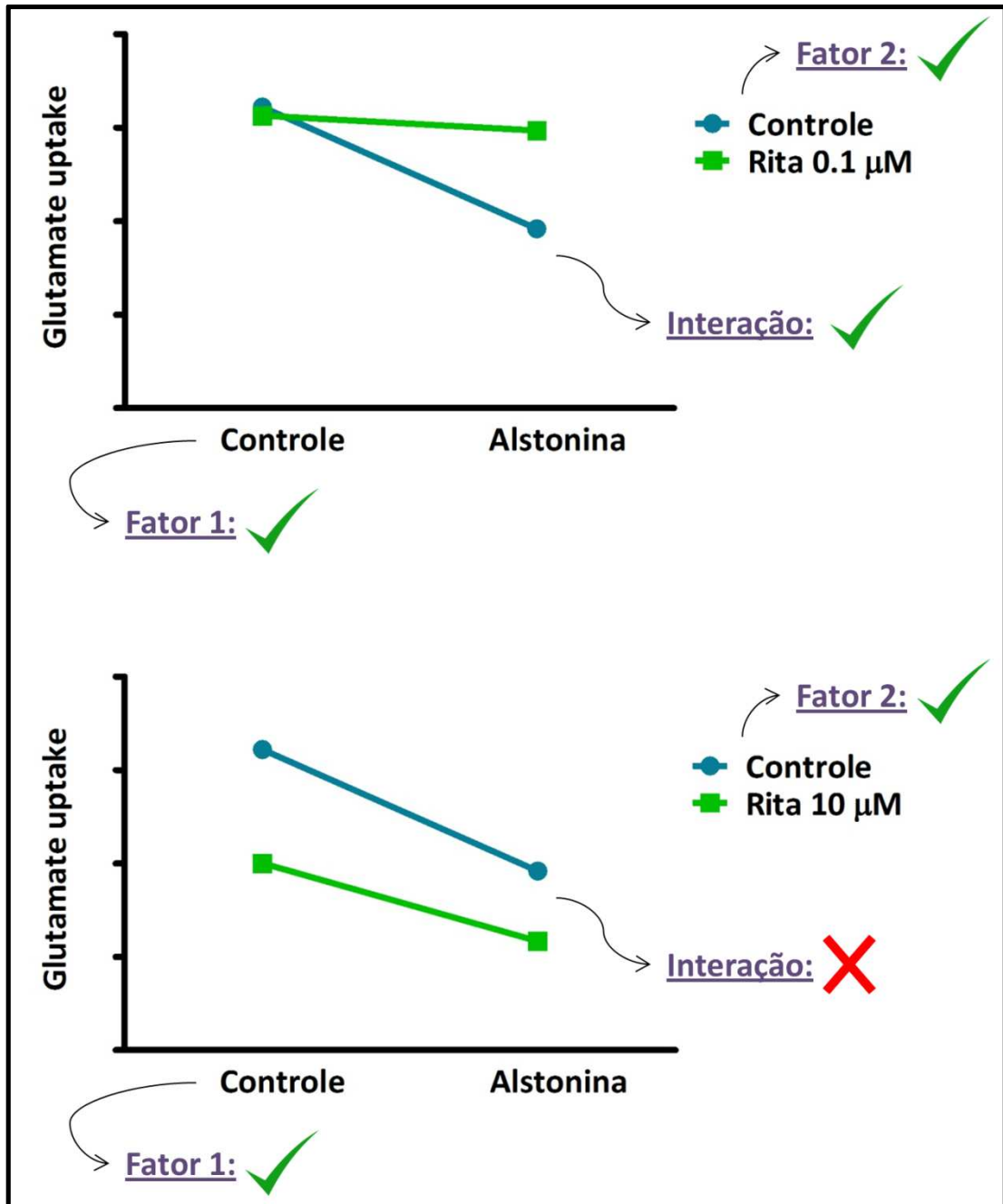
Este trabalho teve por objetivo principal dar continuidade à caracterização de alstonina como fármaco antipsicótico, colaborando para a elucidação de seu mecanismo de ação no que diz respeito ao glutamato. Especificamente, utilizamos o modelo de fatias hipocâmpais agudas, que preserva a interação entre neurônios e glia, no qual investigamos os efeitos de alstonina sobre a captação de glutamato, conteúdo de glutatona e secreção de S100B.

Tais parâmetros foram averiguados pois alterações na transmissão glutamatérgica estão implicadas na esquizofrenia, e dados da literatura relatam níveis alterados de glutatona e da proteína S100B em pacientes esquizofrênicos. Em resumo, a expressão e a função de transportadores de glutamato parecem estar alteradas em pacientes esquizofrênicos, e sugere-se que um aumento da captação de glutamato por astrócitos poderia resultar na hipofunção glutamatérgica observada em esquizofrenia. Além disso, a

modulação do transporte de glutamato pode representar um novo alvo para o desenvolvimento de novos antipsicóticos.

Observamos neste trabalho que a alstonina, assim como a clozapina, diminuiu a captação de glutamato em fatias hipocâmpais. Diferentemente de clozapina, que na concentração mais alta perdeu o efeito ao ser administrada juntamente com apomorfina, o efeito de alstonina na captação de glutamato não foi modificado por esse agonista dopaminérgico. Esse resultado está de acordo com dados comportamentais e neuroquímicos já publicados pelo grupo (Costa-Campos et al., 1998, Linck et al., 2011), que indicam que alstonina não interage com receptores dopaminérgicos.

Receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>2A/C</sub>, ao contrário, parecem sim estar envolvidos no mecanismo de ação de alstonina, já que seus efeitos em diversos modelos animais foram bloqueados por ritanserina (Costa-Campos et al., 2004a, Linck et al., *in press*). Por essa razão, investigamos se os efeitos de alstonina na captação de glutamato também seriam bloqueados por ritanserina. Observamos que uma concentração baixa de ritanserina (sem efeito *per se* na captação de glutamato) de fato inibiu o efeito de alstonina nesse parâmetro, confirmando nossa hipótese. Por outro lado, ao testar uma concentração maior, que *per se* diminuiu a captação de glutamato, observamos um efeito aditivo: o efeito final da combinação dos dois fármacos foi igual à soma dos efeitos individuais. A figura abaixo ilustra o resultado dessas interações (Fig. 1).



**Fig. 1.** Efeitos de diferentes concentrações de ritanserina sobre a diminuição da captação de glutamato-induzida por alstonina.

Tais resultados, porém, não são conclusivos, já que a ritanserina é um antagonista não seletivo de receptores 5-HT<sub>2A/C</sub>. Para esclarecer qual subtipo de receptor 5-HT<sub>2</sub> está envolvido nos efeitos de alstonina, experimentos com ligantes específicos devem ser realizados.



A glutathiona é produzida a partir de cistina, que é captada pelo astrócito através de um transportador de membrana que troca glutamato por cistina (sistema  $x_c^-$ ), e níveis de glutathiona podem ser considerados como uma medida indireta da atividade desse sistema. A regulação desse sistema pode, portanto, influenciar os níveis de glutamato extracelular e, conseqüentemente, a transmissão glutamatérgica. Interessantemente, os efeitos centrais da *N*-acetilcisteína, um composto precursor de cisteína/glutathiona, corroboram essa ideia. O potencial antipsicótico da *N*-acetilcisteína tem sido demonstrado em estudos clínicos e pré-clínicos. Um estudo em especial mostrou que a substância preveniu os efeitos neuroquímicos e comportamentais induzidos por fenciclidina, o que não aconteceu na presença de um inibidor do trocador cistina-glutamato (Baker et al., 2008). Considerando que a alstonina aumentou os níveis de glutathiona ao mesmo tempo em que diminuiu a captação de glutamato, pode-se cogitar na hipótese de que o sistema  $x_c^-$  esteja de alguma forma implicado no mecanismo de ação de alstonina. Para elucidar essa questão, tanto os efeitos comportamentais quanto os neuroquímicos deste alcaloide devem ser testados em presença de um inibidor do sistema  $x_c^-$  (por exemplo, *S*-4-carboxifenilglicina). Entretanto, é possível que o efeito de alstonina sobre os níveis de glutathiona seja consequência do efeito da alstonina no estado oxidativo; portanto o estado redox das fatias hipocâmpais também deve ser avaliado em experimentos futuros.

Os efeitos da alstonina em outros alvos implicados na modulação da disponibilidade de glutamato também devem ser estudados. É possível avaliar farmacologicamente o papel dos transportadores de glutamato (EAATs) na diminuição da captação induzida por alstonina. Além disso, estudos de microdiálise forneceriam informações mais precisas quanto aos efeitos de alstonina sobre os níveis de glutamato, já que permitem uma avaliação *in vivo* e em diferentes regiões do encéfalo.

Este trabalho ilustra a validade da etnofarmacologia como ferramenta na busca de novos compostos bioativos que, além de eventualmente fornecerem moléculas terapêuticamente úteis, podem originar protótipos de fármacos com mecanismo de ação inovador (Fig. 2).

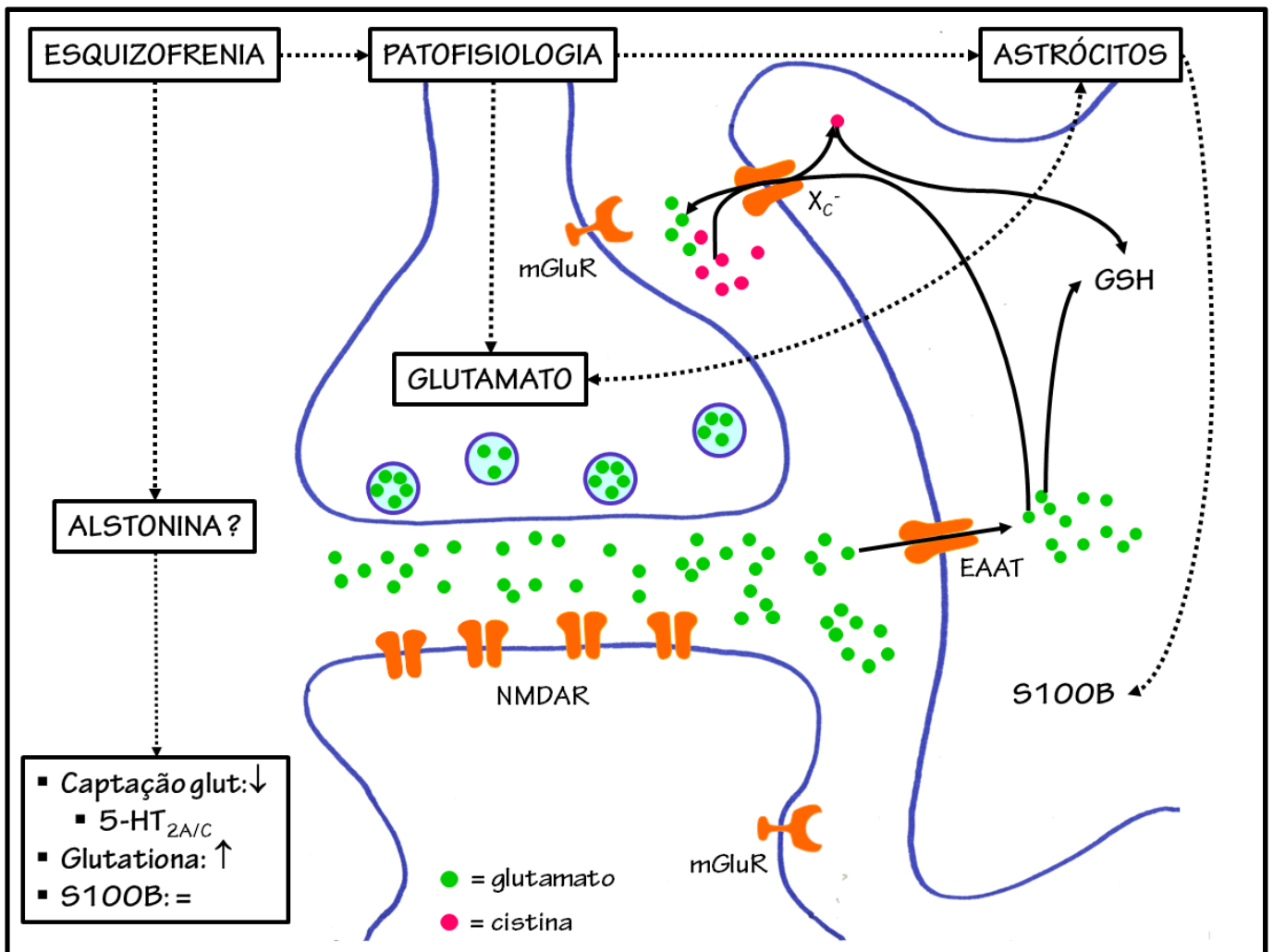


Fig. 2. Resumo gráfico do trabalho.

## REFERÊNCIAS

Abi-Dargham, A., Gil, R., Krystal, J., Baldwin, R.M., Seibyl, J.P., Bowers, M., van Dyck, C.H., Charney, D.S., Innis, R.B., Laruelle, M., 1998. Increased striatal dopamine transmission in schizophrenia: confirmation in a second cohort. *Am J Psychiatry*. 155, 761-7.

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

Abi-Dargham, A., 2004. Do we still believe in the dopamine hypothesis? New data bring new evidence. *Int J Neuropsychopharmacol*. 7 Suppl 1, S1-5.

American Psychiatric Association, 2002. Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais – DSM-IV-TR. 4a ed. Artmed, Porto Alegre.

Anderson, C.M., Swanson, R.A., 2000. Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia*. 32, 1-14.

Andreasen, N.C., 1994. The mechanisms of schizophrenia. *Curr Opin Neurobiol*. 4, 245-51.

Araque, A., Navarrete, M., 2010. Glial cells in neuronal network function. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 365, 2375-81.

Arriza, J.L., Eliasof, S., Kavanaugh, M.P., Amara, S.G., 1997. Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94, 4155-60.

Bak, L.K., Schousboe, A., Waagepetersen, H.S., 2006. The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. *J Neurochem*. 98, 641-53.

Baker, D.A., Madayag, A., Kristiansen, L.V., Meador-Woodruff, J.H., Haroutunian, V., Raju, I., 2008. Contribution of cystine-glutamate antiporters to the psychotomimetic effects of phencyclidine. *Neuropsychopharmacology*. 33, 1760-72.

Ban, T.A., 2004. Neuropsychopharmacology and the genetics of schizophrenia: a history of the diagnosis of schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 28, 753-62.

Bannai, S., Kitamura, E., 1980. Transport interaction of L-cystine and L-glutamate in human diploid fibroblasts in culture. *J Biol Chem*. 255, 2372-6.

Baude, A., Nusser, Z., Roberts, J.D., Mulvihill, E., McIlhinney, R.A., Somogyi, P., 1993. The metabotropic glutamate receptor (mGluR1 alpha) is concentrated at perisynaptic membrane of neuronal subpopulations as detected by immunogold reaction. *Neuron*. 11, 771-87.

Bauer, D., Gupta, D., Harotunian, V., Meador-Woodruff, J.H., McCullumsmith, R.E., 2008. Abnormal expression of glutamate transporter and transporter interacting molecules in prefrontal cortex in elderly patients with schizophrenia. *Schizophr Res.* 104, 108-20.

Bernstein, H.G., Steiner, J., Bogerts, B., 2009. Glial cells in schizophrenia: pathophysiological significance and possible consequences for therapy. *Expert Rev Neurother.* 9, 1059-71.

Bjerkenstedt, L., Edman, G., Hagenfeldt, L., Sedvall, G., Wiesel, F.A., 1985. Plasma amino acids in relation to cerebrospinal fluid monoamine metabolites in schizophrenic patients and healthy controls. *Br J Psychiatry.* 147, 276-82.

Bora, E., Yücel, M., Pantelis, C., 2010. Cognitive impairment in schizophrenia and affective psychoses: implications for DSM-V criteria and beyond. *Schizophr Bull.* 36, 36-42.

Breese, G.R., Knapp, D.J., Moy, S.S., 2002. Integrative role for serotonergic and glutamatergic receptor mechanisms in the action of NMDA antagonists: potential relationships to antipsychotic drug actions on NMDA antagonist responsiveness. *Neurosci Biobehav Rev.* 26, 441-55.

Breier, A., Su, T.P., Saunders, R., Carson, R.E., Kolachana, B.S., de Bartolomeis, A., Weinberger, D.R., Weisenfeld, N., Malhotra, A.K., Eckelman, W.C., Pickar, D., 1997. Schizophrenia is associated with elevated amphetamine-induced synaptic dopamine concentrations: evidence from a novel positron emission tomography method. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94, 2569-74.

Brunton, L.L., Chabner, B.A., Knollmann, B.C., 2011. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 12a ed. McGraw-Hill, New York.

Buchanan, R.W., Freedman, R., Javitt, D.C., Abi-Dargham, A., Lieberman, J.A., 2007. Recent advances in the development of novel pharmacological agents for the treatment of cognitive impairments in schizophrenia. *Schizophr Bull.* 33, 1120-30.

Carlsson, aA., Lindqvist, M., 1963. Effect of chlorpromazine or haloperidol on formation of 3-methoxytyramine and normetanephrine in mouse brain. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)*. 20, 140-4.

Ciccarelli, R., Di Iorio, P., Bruno, V., Battaglia, G., D'Alimonte, I., D'Onofrio, M., Nicoletti, F., Caciagli, F., 1999. Activation of A(1) adenosine or mGlu3 metabotropic glutamate receptors enhances the release of nerve growth factor and S-100beta protein from cultured astrocytes. *Glia*. 27, 275-81.

Costa-Campos, L., Lara, D.R., Nunes, D.S., Elisabetsky, E., 1998. Antipsychotic-like profile of alstonine. *Pharmacol Biochem Behav.* 60, 133-41.

Costa-Campos, L., Elisabetsky, E., Lara, D.R., Carlson, T.J., King, S.R., Ubillas, R., Nunes, D.S., Iwu, M.M., Nkemjika, C.O., Ozioko, A., Agwu, C.O., 1999. Antipsychotic profile of alstonine: ethnopharmacology of a traditional Nigerian botanical remedy. *An Acad Bras Cienc.* 71, 189-201.

Costa-Campos, L., Dassoler, S.C., Rigo, A.P., Iwu, M., Elisabetsky, E., 2004a. Anxiolytic properties of the antipsychotic alkaloid alstonine. *Pharmacol Biochem Behav.* 77, 481-9.

Costa-Campos, L., Iwu, M., Elisabetsky, E., 2004b. Lack of pro-convulsant activity of the antipsychotic alkaloid alstonine. *J Ethnopharmacol.* 93, 307-10.

Cotter, D.R., Pariante, C.M., Everall, I.P., 2001. Glial cell abnormalities in major psychiatric disorders: the evidence and implications. *Brain Res Bull.* 55, 585-95.

Davey, G.E., Murmann, P., Heizmann, C.W., 2001. Intracellular Ca<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> levels regulate the alternative cell density-dependent secretion of S100B in human glioblastoma cells. *J Biol Chem.* 276, 30819-26.

Diamond, J.S., 2001. Neuronal glutamate transporters limit activation of NMDA receptors by neurotransmitter spillover on CA1 pyramidal cells. *J Neurosci.* 21, 8328-38.

Donato, R., 2001. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol.* 33, 637-68.

Donato, R., 2003. Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. *Microsc Res Tech.* 60, 540-51.

Dringen, R., Gutterer, J.M., Hirrlinger, J., 2000. Glutathione metabolism in brain metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. *Eur J Biochem.* 267, 4912-6.

Dringen, R., Hirrlinger, J., 2003. Glutathione pathways in the brain. *Biol Chem.* 384, 505-16.

Edmonds, B., Gibb, A.J., Colquhoun, D., 1995. Mechanisms of activation of glutamate receptors and the time course of excitatory synaptic currents. *Annu Rev Physiol.* 57, 495-519.

Fairman, W.A., Vandenberg, R.J., Arriza, J.L., Kavanaugh, M.P., Amara, S.G., 1995. An excitatory amino-acid transporter with properties of a ligand-gated chloride channel. *Nature.* 375, 599-603.

Fellin, T., Carmignoto, G., 2004. Neurone-to-astrocyte signalling in the brain represents a distinct multifunctional unit. *J Physiol.* 559, 3-15.

Furuta, A., Rothstein, J.D., Martin, L.J., 1997. Glutamate transporter protein subtypes are expressed differentially during rat CNS development. *J Neurosci.* 17, 8363-75.

Gattaz, W.F., Gattaz, D., Beckmann, H., 1982. Glutamate in schizophrenics and healthy controls. *Arch Psychiatr Nervenkr.* 231, 221-5.



Goff, D.C., Coyle, J.T., 2001. The emerging role of glutamate in the pathophysiology and treatment of schizophrenia. *Am J Psychiatry*. 158, 1367-77.

Goldner, E.M., Hsu, L., Waraich, P., Somers, J.M., 2002. Prevalence and incidence studies of schizophrenic disorders: a systematic review of the literature. *Can J Psychiatry*. 47, 833-43.

Gonçalves, D., Karl, J., Leite, M., Rotta, L., Salbego, C., Rocha, E., Wofchuk, S., Gonçalves, C.A., 2002. High glutamate decreases S100B secretion stimulated by serum deprivation in astrocytes. *Neuroreport*. 13, 1533-5.

Had-Aissouni, L., Ré, D.B., Nieoullon, A., Kerkerian-Le Goff, L., 2002. Importance of astrocytic inactivation of synaptically released glutamate for cell survival in the central nervous system-are astrocytes vulnerable to low intracellular glutamate concentrations? *J Physiol Paris*. 96, 317-22.

Hisano, S., 2003. Vesicular glutamate transporters in the brain. *Anat Sci Int*. 78, 191-204.

Huang, Y.H., Sinha, S.R., Tanaka, K., Rothstein, J.D., Bergles, D.E., 2004. Astrocyte glutamate transporters regulate metabotropic glutamate receptor-mediated excitation of hippocampal interneurons. *J Neurosci*. 24, 4551-9.

Huerta, I., McCullumsmith, R.E., Haroutunian, V., Giménez-Amaya, J.M., Meador-Woodruff, J.H., 2006. Expression of excitatory amino acid transporter interacting protein transcripts in the thalamus in schizophrenia. *Synapse*. 59, 394-402.

Huppert, J.D., Weiss, K.A., Lim, R., Pratt, S., Smith, T.E., 2001. Quality of life in schizophrenia: contributions of anxiety and depression. *Schizophr Res.* 51, 171-80.

Izquierdo, I., Medina, J.H., 1997. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiol Learn Mem.* 68, 285-316.

Johnston-Wilson, N.L., Sims, C.D., Hofmann, J.P., Anderson, L., Shore, A.D., Torrey, E.F., Yolken, R.H., 2000. Disease-specific alterations in frontal cortex brain proteins in schizophrenia, bipolar disorder, and major depressive disorder. The Stanley Neuropathology Consortium. *Mol Psychiatry.* 5, 142-9.

Kanai, Y., Hediger, M.A., 1992. Primary structure and functional characterization of a high-affinity glutamate transporter. *Nature.* 360, 467-71.

Katsel, P., Byne, W., Roussos, P., Tan, W., Siever, L., Haroutunian, V., 2011. Astrocyte and glutamate markers in the superficial, deep, and white matter layers of the anterior cingulate gyrus in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology.* 36, 1171-7.

Kegeles, L.S., Abi-Dargham, A., Zea-Ponce, Y., Rodenhiser-Hill, J., Mann, J.J., Van Heertum, R.L., Cooper, T.B., Carlsson, A., Laruelle, M., 2000. Modulation of amphetamine-induced striatal dopamine release by ketamine in humans: implications for schizophrenia. *Biol Psychiatry.* 48, 627-40.

Keith, S.J., Pani, L., Nick, B., Emsley, R., San, L., Turner, M., Conley, R., Scully, P., Chue, P.S., Lachaux, B., 2004. Practical application of pharmacotherapy with long-acting risperidone for patients with schizophrenia. *Psychiatr Serv.* 55, 997-1005.

Kim, J.S., Kornhuber, H.H., Schmid-Burgk, W., Holzmüller, B., 1980. Low cerebrospinal fluid glutamate in schizophrenic patients and a new hypothesis on schizophrenia. *Neurosci Lett.* 20, 379-82.

Kondziella, D., Brenner, E., Eyjolfsson, E.M., Sonnewald, U., 2007. How do glial-neuronal interactions fit into current neurotransmitter hypotheses of schizophrenia? *Neurochem Int.* 50, 291-301.

Korpi, E.R., Kaufmann, C.A., Marnela, K.M., Weinberger, D.R., 1987. Cerebrospinal fluid amino acid concentrations in chronic schizophrenia. *Psychiatry Res.* 20, 337-45.

Kvamme, E., Roberg, B., Torgner, I.A., 2000. Phosphate-activated glutaminase and mitochondrial glutamine transport in the brain. *Neurochem Res.* 25, 1407-19.

Laruelle, M., Abi-Dargham, A., van Dyck, C.H., Gil, R., D'Souza, C.D., Erdos, J., McCance, E., Rosenblatt, W., Fingado, C., Zoghbi, S.S., Baldwin, R.M., Seibyl, J.P., Krystal, J.H., Charney, D.S., Innis, R.B., 1996. Single photon emission computerized tomography imaging of amphetamine-induced dopamine release in drug-free schizophrenic subjects. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93, 9235-40.

Lieberman, J.A., Stroup, T.S., McEvoy, J.P., Swartz, M.S., Rosenheck, R.A., Perkins, D.O., Keefe, R.S., Davis, S.M., Davis, C.E., Lebowitz, B.D., Severe, J., Hsiao, J.K., Investigators, C.A.T.o.I.E.C., 2005. Effectiveness of antipsychotic drugs in patients with chronic schizophrenia. *N Engl J Med.* 353, 1209-23.

Lieberman, J.A., Hsiao, J.K., 2006. Interpreting the results of the CATIE study. *Psychiatr Serv.* 57, 139.

Linck, V.M., Bessa, M.M., Herrmann, A.P., Iwu, M., Okunji, C.O., Elisabetsky, E., *in press*. 5HT<sub>2A/C</sub> receptors mediate the antipsychotic-like effects of the putative antipsychotic alstonine. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*.

Linck, V.M., Herrmann, A.P., Piato, A.L., Detanico, B.C., Figueiró, M., Flório, J., Iwu, M., Okunji, C.O., Leal, M.B., Elisabetsky, E., 2011. Alstonine as an Antipsychotic: Effects on Brain Amines and Metabolic Changes. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2011, 1-7.

Liu, X., Chen, C., Smith, B.J., 2008. Progress in brain penetration evaluation in drug discovery and development. *J Pharmacol Exp Ther.* 325, 349-56.

Luján, R., Roberts, J.D., Shigemoto, R., Ohishi, H., Somogyi, P., 1997. Differential plasma membrane distribution of metabotropic glutamate receptors mGluR1 alpha, mGluR2 and mGluR5, relative to neurotransmitter release sites. *J Chem Neuroanat.* 13, 219-41.

Lyon, G.J., Abi-Dargham, A., Moore, H., Lieberman, J.A., Javitch, J.A., Sulzer, D., 2011. Presynaptic regulation of dopamine transmission in schizophrenia. *Schizophr Bull.* 37, 108-17.

Macciardi, F., Lucca, A., Catalano, M., Marino, C., Zanardi, R., Smeraldi, E., 1990. Amino acid patterns in schizophrenia: some new findings. *Psychiatry Res.* 32, 63-70.

Matute, C., Melone, M., Vallejo-Illarramendi, A., Conti, F., 2005. Increased expression of the astrocytic glutamate transporter GLT-1 in the prefrontal cortex of schizophrenics. *Glia.* 49, 451-5.

McCullumsmith, R.E., Meador-Woodruff, J.H., 2002. Striatal excitatory amino acid transporter transcript expression in schizophrenia, bipolar disorder, and major depressive disorder. *Neuropsychopharmacology.* 26, 368-75.

McDonald, J.W., Johnston, M.V., 1990. Physiological and pathophysiological roles of excitatory amino acids during central nervous system development. *Brain Res Brain Res Rev.* 15, 41-70.

Melone, M., Bragina, L., Conti, F., 2003. Clozapine-induced reduction of glutamate transport in the frontal cortex is not mediated by GLAST and EAAC1. *Mol Psychiatry.* 8, 12-3.

Meltzer, H.Y., 1997. Treatment-resistant schizophrenia--the role of clozapine. *Curr Med Res Opin.* 14, 1-20.

Meltzer, H.Y., 2004. Cognitive factors in schizophrenia: causes, impact, and treatment. *CNS Spectr.* 9, 15-24.

Moore, B.W., 1965. A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem Biophys Res Commun.* 19, 739-44.

Nanitsos, E.K., Nguyen, K.T., St'astný, F., Balcar, V.J., 2005. Glutamatergic hypothesis of schizophrenia: involvement of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-dependent glutamate transport. *J Biomed Sci.* 12, 975-84.

Nardin, P., Tramontina, A.C., Quincozes-Santos, A., Tortorelli, L.S., Lunardi, P., Klein, P.R., Wartchow, K.M., Bobermin, L.D., Gottfried, C., Elisabetsky, E., Gonçalves, C.A., 2011. In vitro S100B secretion is reduced by apomorphine: effects of antipsychotics and antioxidants. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 35, 1291-6.

Nedergaard, M., Takano, T., Hansen, A.J., 2002. Beyond the role of glutamate as a neurotransmitter. *Nat Rev Neurosci.* 3, 748-55.

Norenberg, M.D., Martinez-Hernandez, A., 1979. Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain. *Brain Res.* 161, 303-10.

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

Okunji, C.O., Iwu, M.M., Ito, Y., 2005. Preparative separation of indole alkaloids from the rind of *Picralima nitida* (Stapf) T. Durand & H. Durand by pH-Zone-refining countercurrent chromatography. *J Liq Chromatog Rel Technol.* 28, 775-83.

Olney, J.W., Newcomer, J.W., Farber, N.B., 1999. NMDA receptor hypofunction model of schizophrenia. *J Psychiatr Res.* 33, 523-33.

Ongür, D., Drevets, W.C., Price, J.L., 1998. Glial reduction in the subgenual prefrontal cortex in mood disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95, 13290-5.

Opgen-Rhein, C., Dettling, M., 2008. Clozapine-induced agranulocytosis and its genetic determinants. *Pharmacogenomics.* 9, 1101-11.

Ozawa, S., Kamiya, H., Tsuzuki, K., 1998. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol.* 54, 581-618.

Perea, G., Araque, A., 2005. Glial calcium signaling and neuron-glia communication. *Cell Calcium.* 38, 375-82.

Perea, G., Navarrete, M., Araque, A., 2009. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci.* 32, 421-31.

Perry, T.L., 1982. Normal cerebrospinal fluid and brain glutamate levels in schizophrenia do not support the hypothesis of glutamatergic neuronal dysfunction. *Neurosci Lett.* 28, 81-5.

Perälä, J., Suvisaari, J., Saarni, S.I., Kuoppasalmi, K., Isometsä, E., Pirkola, S., Partonen, T., Tuulio-Henriksson, A., Hintikka, J., Kieseppä, T., Härkänen, T., Koskinen, S., Lönnqvist, J., 2007. Lifetime prevalence of psychotic and bipolar I disorders in a general population. *Arch Gen Psychiatry*. 64, 19-28.

Pines, G., Danbolt, N.C., Bjørås, M., Zhang, Y., Bendahan, A., Eide, L., Koepsell, H., Storm-Mathisen, J., Seeberg, E., Kanner, B.I., 1992. Cloning and expression of a rat brain L-glutamate transporter. *Nature*. 360, 464-7.

Quincozes-Santos, A., Abib, R.T., Leite, M.C., Bobermin, D., Bambini-Junior, V., Gonçalves, C.A., Riesgo, R., Gottfried, C., 2008. Effect of the atypical neuroleptic risperidone on morphology and S100B secretion in C6 astroglial lineage cells. *Mol Cell Biochem*. 314, 59-63.

Rajkowska, G., Miguel-Hidalgo, J.J., Makkos, Z., Meltzer, H., Overholser, J., Stockmeier, C., 2002. Layer-specific reductions in GFAP-reactive astroglia in the dorsolateral prefrontal cortex in schizophrenia. *Schizophr Res*. 57, 127-38.

Robinson, M.B., 2002. Regulated trafficking of neurotransmitter transporters: common notes but different melodies. *J Neurochem*. 80, 1-11.

Rothermundt, M., Falkai, P., Ponath, G., Abel, S., Bürkle, H., Diedrich, M., Hetzel, G., Peters, M., Siegmund, A., Pedersen, A., Maier, W., Schramm, J., Suslow, T., Ohrmann, P., Arolt, V., 2004. Glial cell dysfunction in schizophrenia indicated by increased S100B in the CSF. *Mol Psychiatry*. 9, 897-9.



Rothermundt, M., Ohrmann, P., Abel, S., Siegmund, A., Pedersen, A., Ponath, G., Suslow, T., Peters, M., Kaestner, F., Heindel, W., Arolt, V., Pfleiderer, B., 2007. Glial cell activation in a subgroup of patients with schizophrenia indicated by increased S100B serum concentrations and elevated myo-inositol. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 31, 361-4.

Rouach, N., Koulakoff, A., Giaume, C., 2004. Neurons set the tone of gap junctional communication in astrocytic networks. *Neurochem Int*. 45, 265-72.

Rund, B.R., 2009. Is there a degenerative process going on in the brain of people with Schizophrenia? *Front Hum Neurosci*. 3, 36.

Saha, S., Chant, D., Welham, J., McGrath, J., 2005. A systematic review of the prevalence of schizophrenia. *PLoS Med*. 2, e141.

Schaub, D., Brüne, M., Jaspén, E., Pajonk, F.G., Bierhoff, H.W., Juckel, G., 2011. The illness and everyday living: close interplay of psychopathological syndromes and psychosocial functioning in chronic schizophrenia. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 261, 85-93.

Schroeter, M.L., Abdul-Khaliq, H., Krebs, M., Diefenbacher, A., Blasig, I.E., 2009. Neuron-specific enolase is unaltered whereas S100B is elevated in serum of patients with schizophrenia--original research and meta-analysis. *Psychiatry Res*. 167, 66-72.

Schroeter, M.L., Steiner, J., 2009. Elevated serum levels of the glial marker protein S100B are not specific for schizophrenia or mood disorders. *Mol Psychiatry*. 14, 235-7.

Selemon, L.D., Lidow, M.S., Goldman-Rakic, P.S., 1999. Increased volume and glial density in primate prefrontal cortex associated with chronic antipsychotic drug exposure. *Biol Psychiatry*. 46, 161-72.

Shigeri, Y., Seal, R.P., Shimamoto, K., 2004. Molecular pharmacology of glutamate transporters, EAATs and VGLUTs. *Brain Res Brain Res Rev*. 45, 250-65.

Stahl, S.M., 2008. *Antipsychotics and Mood Stabilizers: Stahl's Essential Psychopharmacology*. 3a ed. Cambridge University Press, Cambridge.

Steiner, J., Schroeter, M.L., Schiltz, K., Bernstein, H.G., Müller, U.J., Richter-Landsberg, C., Müller, W.E., Walter, M., Gos, T., Bogerts, B., Keilhoff, G., 2010. Haloperidol and clozapine decrease S100B release from glial cells. *Neuroscience*. 167, 1025-31.

Storck, T., Schulte, S., Hofmann, K., Stoffel, W., 1992. Structure, expression, and functional analysis of a Na(+)-dependent glutamate/aspartate transporter from rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89, 10955-9.

Tabb, J.S., Kish, P.E., Van Dyke, R., Ueda, T., 1992. Glutamate transport into synaptic vesicles. Roles of membrane potential, pH gradient, and intravesicular pH. *J Biol Chem*. 267, 15412-8.

Tanaka, K., Watase, K., Manabe, T., Yamada, K., Watanabe, M., Takahashi, K., Iwama, H., Nishikawa, T., Ichihara, N., Kikuchi, T., Okuyama, S., Kawashima, N., Hori, S., Takimoto, M.,

Wada, K., 1997. Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. *Science*. 276, 1699-702.

Tandon, R., Jibson, M.D., 2003. Efficacy of newer generation antipsychotics in the treatment of schizophrenia. *Psychoneuroendocrinology*. 28 Suppl 1, 9-26.

Tramontina, F., Tramontina, A.C., Souza, D.F., Leite, M.C., Gottfried, C., Souza, D.O., Wofchuk, S.T., Gonçalves, C.A., 2006. Glutamate uptake is stimulated by extracellular S100B in hippocampal astrocytes. *Cell Mol Neurobiol*. 26, 81-6.

Uranova, N.A., Casanova, M.F., DeVaughn, N.M., Orlovskaya, D.D., Denisov, D.V., 1996. Ultrastructural alterations of synaptic contacts and astrocytes in postmortem caudate nucleus of schizophrenic patients. *Schizophr Res*. 22, 81-3.

Vallejo-Illarramendi, A., Torres-Ramos, M., Melone, M., Conti, F., Matute, C., 2005. Clozapine reduces GLT-1 expression and glutamate uptake in astrocyte cultures. *Glia*. 50, 276-9.

Van Eldik, L.J., Wainwright, M.S., 2003. The Janus face of glial-derived S100B: beneficial and detrimental functions in the brain. *Restor Neurol Neurosci*. 21, 97-108.

van Os, J., Kenis, G., Rutten, B.P., 2010. The environment and schizophrenia. *Nature*. 468, 203-12.

Webster, M.J., Knable, M.B., Johnston-Wilson, N., Nagata, K., Inagaki, M., Yolken, R.H., 2001. Immunohistochemical localization of phosphorylated glial fibrillary acidic protein in the prefrontal cortex and hippocampus from patients with schizophrenia, bipolar disorder, and depression. *Brain Behav Immun.* 15, 388-400.

Webster, M.J., O'Grady, J., Kleinman, J.E., Weickert, C.S., 2005. Glial fibrillary acidic protein mRNA levels in the cingulate cortex of individuals with depression, bipolar disorder and schizophrenia. *Neuroscience.* 133, 453-61.

Whitaker-Azmitia, P.M., Murphy, R., Azmitia, E.C., 1990. Stimulation of astroglial 5-HT<sub>1A</sub> receptors releases the serotonergic growth factor, protein S-100, and alters astroglial morphology. *Brain Res.* 528, 155-8.

Wiesmann, M., Wandinger, K.P., Missler, U., Eckhoff, D., Rothermundt, M., Arolt, V., Kirchner, H., 1999. Elevated plasma levels of S-100b protein in schizophrenic patients. *Biol Psychiatry.* 45, 1508-11.

Wu, E.Q., Birnbaum, H.G., Shi, L., Ball, D.E., Kessler, R.C., Moulis, M., Aggarwal, J., 2005. The economic burden of schizophrenia in the United States in 2002. *J Clin Psychiatry.* 66, 1122-9.

Xia, Z., Gray, J.A., Compton-Toth, B.A., Roth, B.L., 2003. A direct interaction of PSD-95 with 5-HT<sub>2A</sub> serotonin receptors regulates receptor trafficking and signal transduction. *J Biol Chem.* 278, 21901-8.