

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA**

**Influência do antipsicótico atípico ziprasidona sobre o
metabolismo de lipídios e comportamento do nematódeo
Caenorhabditis elegans.**

PRISCILA GUBERT

**Belo Horizonte
2012**

PRISCILA GUBERT

Influência do antipsicótico atípico ziprasidona sobre o metabolismo de lipídios e comportamento do nematódeo *Caenorhabditis elegans*.

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Molecular da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para obtenção do grau mestre em Medicina Molecular.

Área de concentração: Medicina Molecular

Orientador: Prof. Dr. Marco Aurélio Romano-Silva

Coorientador: Dr. Alexandre de G. A. Barros

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA**

Belo Horizonte – 2012

Gubert, Priscila.
G921i Influência do antipsicótico atípico ziprasidona sobre o metabolismo de lipídios e comportamento do nematódeo *Caenorhabditis elegans* [manuscrito]. / Priscila Gubert. -- Belo Horizonte: 2012. 65f.: il.
Orientador: Marco Aurélio Romano Silva.
Co-Orientador: Alexandre Guimarães de Almeida Barros.
Área de concentração: Medicina Molecular.
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Antipsicóticos/efeitos adversos. 2. Metabolismo dos Lipídeos. 3. *Caenorhabditis elegans*/metabolismo. 4. Síndrome X Metabólica. 5. Dissertações Acadêmicas. I. Romano-Silva, Marco Aurélio. II. Barros, Alexandre Guimarães de Almeida. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: OV 77.9

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca J. Baeta Vianna – Campus Saúde UFMG



FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO
Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533
Belo Horizonte - MG - CEP 310-100
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640
cra@medicina.ufmg.br



ATA DA DEFESA DE MESTRADO DE PRISCILA GUBERT, nº de registro 2010725950. No dia **dois de março de dois mil e doze**, reuniu-se na Faculdade de Medicina da UFMG, a Comissão Examinadora de dissertação indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: **"INFLUÊNCIA DO ANTIPSICÓTICO ATÍPICO ZIPRASIDONA SOBRE O METABOLISMO DE LIPÍDIOS E COMPORTAMENTO DO NEMATÓDEO C. ELEGANS"**, requisito final para a obtenção do Grau de Mestre em Medicina Molecular, pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina Molecular. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Marco Aurélio Romano Silva, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do trabalho final, passou a palavra a candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu sem a presença da candidata e do público para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof. Marco Aurélio Romano Silva/ orientador	Instituição: UFMG	Indicação: <u>APROVADA</u>
Prof. Alexandre Guimarães de Almeida Barros/ co-orientador	Instituição: UFMG	Indicação: <u>APROVADA</u>
Prof. Luiz Armando Cunha De Marco	Instituição: UFMG	Indicação: <u>APROVADA</u>
Prof.ª Antoniana Ursine Krettli	Instituição: FIOCRUZ	Indicação: <u>APROVADA</u>

Pelas indicações a candidata foi considerada APROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente a candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.
Belo Horizonte, 02 de março de 2012.

Prof. Marco Aurélio Romano Silva/ orientador _____

Prof. Alexandre Guimarães de Almeida Barros / co-orientador _____

Prof. Luiz Armando Cunha De Marco _____

Prof.ª Antoniana Ursine Krettli _____

Prof. Luiz Armando Cunha De Marco/ Coordenador _____

Prof. Luiz Armando Cunha De Marco
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em
Medicina Molecular - Faculdade de Medicina UFMG

Obs: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador.

Recôps
CONFERE COM O ORIGINAL
Centro de Pós-Graduação



FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640



DECLARAÇÃO

A Comissão Examinadora abaixo assinada, composta pelos Professores Prof. Marco Aurélio Romano Silva (presidente), Prof. Alexandre Guimarães de Almeida Barros/co-orientador, Prof. Luiz Armando Cunha De Marco, Prof.^a Antoniana Ursine Krettli (membros titulares) e Prof.^a Daniela Valadão (membro suplente), aprovou a defesa da Dissertação de Mestrado de **PRISCILA GUBERT**. A Dissertação foi intitulada “**INFLUÊNCIA DO ANTIPSICÓTICO ATÍPICO ZIPRASIDONA SOBRE O METABOLISMO DE LIPÍDIOS E COMPORTAMENTO DO NEMATÓDEO C. ELEGANS**”, estando à mesma apta à obtenção do título de Mestre em Medicina Molecular, pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais.

Belo Horizonte, 02 de março de 2012.

Prof. Marco Aurélio Romano Silva
orientador

Prof. Alexandre Guimarães de Almeida Barros
co-orientador

Prof. Luiz Armando Cunha De Marco

Prof.^a Antoniana Ursine Krettli

*Aos meus amores,
Paulo Antônio, Maria Neli e Greici.*

Agradecimentos

Este trabalho jamais teria se concretizado sem a ajuda de inúmeras pessoas que contribuíram ao longo de todo este processo.

Gostaria de expressar minha imensa gratidão ao Prof. Marco Aurélio que não somente permitiu que eu fizesse parte do seu grupo de pesquisa, mas também confiou no meu trabalho durante esses dois anos. À prof^a. Débora, prof. Luiz Armando, prof. Marcus Vinícius e demais professores do Departamento de Saúde Mental da Universidade Federal de Minas Gerais que contribuíram com conhecimentos, conselhos e compreensão.

À CAPES, pelo apoio financeiro e pela bolsa de mestrado.

Aos colegas do laboratório de neurociência da UFMG, obrigada pela paciência, companhia e sorrisos ao longo desse tempo. Vocês foram fundamentais para a minha permanência em Minas Gerais e certamente estarão para sempre em um lugar muito especial no meu coração.

Agradeço à Paula e ao Pacheco pela companhia e ajuda durante todo o tempo em que estive em BH. Ao Gabriel pelo suporte emocional, científico, familiar em todos os minutos. Amigo, sentirei muitas saudades das nossas conversas na árvore, das festas, das histórias, discussões. Obrigada por me emprestar teu tempo, teu afeto, tua família e até o Nick de vez em quando.

Minha gratidão ao Tácito pelo auxílio na realização deste trabalho. À Jessika, IC, filhota, amiga, afilhada...é difícil te definir. Obrigada por tudo. Pelas “gaitadas” e por tornar meus dias mais leves com a tua companhia sempre animada. À Dani minha mama, obrigada pelos conselhos, conversas e apoio juntamente com papai Ricardo.

*Aos colegas do lab. do prof. Félix: Nelson, Gui, Leti, Mondonguinho, Michi, Rômulo, Tássia, Glaubia, Edovando, Glaecir e Silvío. Vocês são meu tudo e mais um pouco. Ao Félix ter iniciado o meu caminho como pesquisadora e à Daia por me tornar apaixonada pelo *C. elegans*.*

Às amigas do coração Ana Paula, Gra, Sara, Maiara, Cris, Nardeli e Vanessa que estiveram sempre ao meu lado em todos os momentos.

Aos meus padrinhos, madrinhas, amigos, afilhados, compadres e familiares. Agradeço também aos meus avós que deixaram lindos exemplos e uma saudade infinita.

Ao Vini, meu cunhadinho super atencioso, sempre disponível.

Ao Rômulo, obrigada por me mostrar que o meu coração não era a pedrinha que eu imaginava. Por encher os meus dias de alegria e a minha face de sorrisos incontidos... como se não houvesse o amanhã.

Greicinha, obrigada por me ensinar a ter paciência, tolerância e a ser um pouquinho mais organizada.

Paizinho, a ti agradeço o otimismo infundável. Mesmo quando tudo deu diferente do que eu queria, tu ainda acreditou que um dia iria dar certo..e deu pai..deu muito certo!

Mãe, a ti agradeço as horas de preocupação, de estresse, de paciência e de carinho. Pelas inúmeras malas arrumadas e pelas comidinhas. Vocês são exemplos de pais porque escolheram, para mim e para Greici, o melhor. Semearam acima de tudo e com todo o amor possível, o bem.

Muito obrigada por serem nossos pais, por acreditarem nas loucuras que eu idealizo para minha vida. Por nos darem a chance de voar, pois vocês sabem que o amor não prende, ele deve libertar. E se até hoje nós continuamos voltando é porque reconhecemos em nosso lar uma fonte verdadeira de puro e imenso amor. Não esqueçam que vocês nunca estiveram tão perto de mim como nestes dois anos.

Finalmente, agradeço a Deus que me encheu de força e coragem para chegar até aqui.

Muito obrigada!

“Saber não é tudo.

É necessário fazer.

*E para bem fazer, homem algum dispensará a calma e a serenidade,
imprescindíveis ao êxito, nem desdenhará a cooperação,
que é companheira diletta do amor”.*

Emmanuel

*“You’ll never know how strong you are until being strong is the only
choice you have”.*

Johnny Depp

Resumo

A síndrome metabólica é um dos principais efeitos colaterais relacionado ao uso de antipsicóticos atípicos. Mesmo pertencendo a esta classe de fármacos, a ziprasidona tem sido pouco associada como geradora de tais efeitos principalmente quanto ao ganho de peso. No entanto, as vias moleculares diferenciais deste fármaco são ainda desconhecidas. Haja vista às inúmeras dificuldades em realizar estudos molecularmente aprofundados relacionados ao metabolismo, o presente estudo foi proposto para averiguar perfil de acúmulo lipídico e possíveis alterações comportamentais em um novo modelo experimental, o nematódeo *Caenorhabditis elegans*. Nossos resultados mostraram que a ziprasidona foi efetiva em reduzir a fluorescência marcada por *Nile Red*, BODIPY e *LipidTox* nas células intestinais do nematódeo *C. elegans* comparado ao controle (dimetilsulfóxido 0.16%). Este efeito foi observado apenas no tratamento por 24 h (estágio larval L4 até adulto). A ziprasidona não alterou comportamentos relacionados ao equilíbrio energético como batimento faríngeo, ciclos de defecação e movimento do *C. elegans* comparada ao grupo controle. Entretanto, verificou-se uma redução importante na produção de ovos, ovoposição e no tamanho dos vermes expostos à ziprasidona sem que houvesse alterações na progressão dos estágios larvais. Além disso, componentes da via serotoninérgica parecem não estar envolvidos no efeito causado pela ziprasidona sobre os níveis de fluorescência de *Nile Red*. Por outro lado, detectou-se uma modulação nos efeitos gerados pela ziprasidona sobre a fluorescência exercida pela exposição exógena à monoamina tiramina, bem como, dos fatores de transcrição DAF-16 e CREB observado através da reversão do perfil de fluorescência nos mutantes para estes fatores aos níveis do controle. Considerando estes resultados, sugere-se que a ziprasidona altera o comportamento reprodutivo, morfologia e as reservas lipídicas nas células intestinais do nematódeo *C. elegans*. Identificamos ainda, a influência da monoamina tiramina e dos fatores de transcrição DAF-16 e CREB na ação da ziprasidona sobre o acúmulo lipídico intestinal neste nematódeo.

Palavras-chave: antipsicóticos atípicos, ziprasidona, *Caenorhabditis elegans*, metabolismo de lipídios.

Abstract

The metabolic syndrome is the major side effect related to atypical antipsychotics use. Even from this drug class, ziprasidone has been rarely associated as generating these effects mainly to weight gain. Nevertheless, the differential molecular pathways of this drug remain largely unknown. Considering the numerous difficulties to perform depth studies related to metabolism, the present study was proposed to evaluate the profile of lipid accumulation and possible behavioral changes in a new experimental model, the nematode *Caenorhabditis elegans*. Our results showed ziprasidone was effective to decrease the fluorescence marked by *Nile Red*, BODIPY and *LipidTox* in intestinal cells of the nematode *C. elegans* comparing to the control (0.16% Dimethyl sulfoxide). This effect was observed only under 24 h of treatment (L4 larval stage until adult). The ziprasidone did not altered the behaviors related to energetic balance such as pharynx pumping, defecation cycles and movement of *C. elegans* compared to the control group. However, there was an important reduction in egg-production, egg-laying and body-length of the nematodes exposed to ziprasidone without any changes in the progression of larval stages. Moreover, the components of serotonergic pathway appear not to be involved in the effect caused by ziprasidone on the levels of *Nile Red* fluorescence. On the other hand, we detected a modulation in the effects generated by ziprasidone on the fluorescence exerted by exogenous tyramine monoamine exposition, as well as the transcription factors DAF-16 and CREB observed by reversing the profile of fluorescence in mutants for these factors to the levels of control. Considering these results, it is suggested that ziprasidone alters reproductive behavior, morphology and lipid reserves in the intestinal cells of the nematode *C. elegans*. We still identify the influence of the tyramine monoamine and the transcription factors DAF-16 and CREB in the ziprasidone action on the lipid accumulation in the intestinal cells of this nematode.

Key-words: atypical antipsychotics, ziprasidone, *Caenorhabditis elegans*, lipid metabolism.

Lista de Figuras

Figura 1 – Estrutura molecular da ziprasidona.....	4
Figura 2 – Ciclo de vida do nematódeo <i>C. elegans</i>	6
Figura 3 – Via de síntese de ácidos graxos no nematódeo <i>C. elegans</i>	9
Figura 4 – Via de sinalização por DAF-16 em <i>C. elegans</i>	11
Figura 5 – Redução da Fluorescência do marcador <i>Nile Red</i> após tratamento com ziprasidona por 24 h em vermes selvagens (N2).....	21
Figura 6 – Redução da Fluorescência induzida pelo tratamento com ziprasidona por 24 h em <i>Caenorhabditis elegans</i> selvagens (N2) evidenciada pelos marcadores BODIPY e <i>LipidTox</i>	22
Figura 7 – Curva tempo-resposta frente ao tratamento com ziprasidona em <i>C. elegans</i> selvagem (N2).....	23
Figura 8 – Avaliação dos comportamentos de batimento faríngeo e ciclos de defecação em vermes selvagens expostos à ziprasidona por 24h.....	24
Figura 9 – Parâmetros representativos do movimento dos nematódeos <i>C. elegans</i> selvagens após exposição à ziprasidona.....	25
Figura 10 – Comportamento reprodutivo do nematódeo <i>C. elegans</i> após exposição à ziprasidona.....	26
Figura 11 – Perímetro do verme selvagem (N2) após tratamento com ziprasidona por 24, 48 e 72 h.....	27
Figura 12 – Desenvolvimento larval do nematódeo <i>C. elegans</i> exposto à ziprasidona.....	28
Figura 13 – Efeito da ziprasidona sobre a fluorescência do marcador <i>Nile Red</i> em vermes mutantes para componentes do sistema serotoninérgico.....	29

Figura 14 – Efeito nos estoques lipídicos da exposição exógena às monoaminas e à ziprasidona vermes selvagens.....	31
Figura 15 – Recuperação do lipídico mensurado através do marcador <i>Nile Red</i> em mutantes para os fatores de transcrição <i>daf-16</i> e <i>crh-1</i> após tratamento com ziprasidona (40 μ M).....	32

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Cepas mutantes de <i>Caenorhabditis elegans</i> utilizadas nos experimentos.....	14
---	----

Sumário

1	Introdução	1
1.1	Antipsicóticos.....	1
1.2	Obesidade, Esquizofrenia e os Antipsicóticos.....	3
1.3	Ziprasidona: uma nova perspectiva.....	4
1.4	O modelo <i>Caenorhabditis elegans</i> e as dificuldades da pesquisa em humanos.....	6
1.5	<i>C. elegans</i> e o metabolismo de lipídios.....	8
1.6	Vias de regulação do metabolismo lipídico no <i>C. elegans</i>	10
2	Objetivo.....	13
2.1	Objetivo geral	13
2.2	Objetivos específicos.....	13
3	Materiais e métodos.....	14
3.1	Condições de cultura e manutenção do verme <i>C. elegans</i>	14
3.2	Tratamento com ziprasidona.....	15
3.3	Tratamento com aminas exógenas.....	16
3.4	Perfil lipídico através de marcadores fluorescentes.....	16
3.5	Ensaio de batimento faríngeo.....	17
3.6	Ensaio de movimento.....	18
3.7	Ensaio de defecação	18
3.8	Ensaios de reprodução	18
3.9	Avaliação do desenvolvimento larval e tamanho.....	19
3.10	Análise de imagens e estatística.....	19
4	Resultados	20
4.1	Perfil lipídico frente ao tratamento com o antipsicótico ziprasidona.....	20
4.2	Efeitos da ziprasidona sobre o comportamento, desenvolvimento e morfologia do <i>C. elegans</i>	24
4.3	<i>Mecanismos de ação da ziprasidona sobre o metabolismo de lipídios</i>	28
5	Discussão.....	33
6	Conclusão e perspectivas	36
7	Referências	38

Lista de Abreviaturas

5-HT	Serotonina
ACBP	Proteínas ligantes de acil-CoA
ACC	Acetil Coa carboxilase
ACh	Acetilcolina
AMP	Monofosfato de adenosina
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOTF	Filtro Sintonizável Óptico-Acústico
ATP	Trifosfato de adenosina
BSA	Albumina de soro bovino
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
C/EBP	Proteína ligante ao amplificador CCAAT
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CCD	Câmera - Dispositivo de carga acoplada
CGC	<i>Caenorhabditis Genetics Center</i>
CoA	Coenzima A
CREB	Proteína ligante ao elemento de resposta do AMP
DA	Dopamina
DAG	1,2 diacilglicerol
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio padrão
DTT	Ditiotreitol
EGTA	Ácido bis(2-aminoetil) etilenoglicol-N,N,N',N'-tetraacético
ELO	Ácido graxo elongase
FABPs	Proteínas ligantes de ácidos graxos
FAS	Ácido graxo sintase
FAT	Ácido graxo dessaturase
FATPs	Proteínas transportadoras de ácidos graxos
Gi	Proteína G da classe i
Gs	Proteína G da classe s
GABA	Ácido γ-aminobutírico

Gq	Proteína G da classe q
H ₂ O _{dd}	Água destilada deionizada
HCl	Ácido clorídrico
IP3	1,4,5 trifosfato de inositol
K ₂ HPO ₄	Fosfato de potássio dibásico
KCl	Cloreto de potássio
KH ₂ PO ₄	Fosfato de potássio monobásico
MgSO ₄	Sulfato de magnésio
N ₂	<i>C. elegans</i> selvagem
NA	Noradrenalina
Na ₂ HPO ₄	Fosfato de sódio dibásico
NaCl	Cloreto de sódio
NaN ₃	Azida de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NHR	Receptores nucleares de hormônios
NMG	Meio de crescimento para nematódeos
NO	Óxido nítrico
OA	Octopamina
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PIP3	Fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfato
PIPES	Ácido Piperazinedietano-sulfônico-1,4
PMT-1	Tubo fotomultiplicador - 1
PUFAS	Ácidos graxos poliinsaturados
RNA	Ácido ribonucléico
SREBP	Elemento de resposta ao esteroide
TA	Tiramina
TGA	Triacilgliceróis
TOR	Alvo da rapamicina
TPH-1	Triptofano hidroxilase
Tris-HCl	Tris-hidroximetilaminometano-HCl
ZIP	Ziprasidona

1 Introdução

1.1 Antipsicóticos

Os transtornos psiquiátricos são caracterizados por anormalidades que comprometem a função mental, com prejuízo evidente para o paciente. Até o momento, a maioria das síndromes permanece sem causa definida.

A exemplo disso, a esquizofrenia é um transtorno mental crônico que atinge cerca de 1% da população. Devido à sintomatologia altamente incapacitante, os indivíduos acometidos apresentam isolamento social e alto índice de suicídio (Meltzer, 2001). A patofisiologia relacionada a estes eventos permanece por vezes impreendida, mas acredita-se que sejam decorrentes do desequilíbrio neuroquímico (Ratnaparkhi *et al.*, 2010), bem como, de alterações morfoestruturais no cérebro (Rehn & Rees, 2005). A hipótese da super ativação do sistema dopaminérgico como mecanismo patológico foi pioneira e surgiu após o uso dos antipsicóticos, os quais são responsáveis por inibir os receptores desta via e reduzir os sintomas relacionados à esquizofrenia (Carlsson, 2001). Alterações envolvendo as vias glutamatérgica, serotoninérgica e gabaérgica também vem sendo relacionadas a esta psicose (Carlsson *et al.*, 2004; Laruelle *et al.*, 2003; de Bartolomeis *et al.*, 2005).

Até a década de 50, o tratamento da esquizofrenia era limitado à utilização da eletroconvulsoterapia e de substâncias como cardiazol e insulina (Steck, 2010). Posteriormente, a descoberta dos antipsicóticos clorpromazina e haloperidol revolucionou a terapêutica da doença, reduzindo a gravidade e a recorrência dos sintomas (Abi-Dargham & Laruelle, 2005).

Independentemente da categoria química, os antipsicóticos possuem a propriedade de inibir receptores dopaminérgicos, existindo uma correlação linear entre o bloqueio do receptor dopaminérgico D₂ e melhor prognóstico (Seeman *et al.*, 1976; Miyamoto *et al.*, 2005).

Atualmente, os primeiros antipsicóticos são classificados como típicos ou de primeira geração. Mesmo oferecendo uma nova perspectiva à utilização terapêutica, estes fármacos apresentam efeitos colaterais limitantes, principalmente transtornos do movimento (rigidez, parkinsonismo, tremores e discinesia tardia). Isto se deve ao

antagonismo farmacológico em vias dopaminérgicas relacionadas a outras funções cerebrais; no caso dos transtornos do movimento, as vias modulatórias do sistema extrapiramidal (Batoool *et al.*, 2010). Mais tarde, um segundo grupo de fármacos, classificados como antipsicóticos atípicos ou de segunda geração, surgiu acompanhado pela proposta de apresentar menos efeitos extrapiramidais que o primeiro grupo.

Ainda não se sabe exatamente qual característica farmacodinâmica é responsável pela diferença clínica observada entre as duas classes. Todavia, alguns estudos sugerem a designação do termo “atipicidade” aos fármacos com atividade sobre outros receptores dopaminérgicos (D_1 , D_3 , D_4) que não o D_2 (Seeman *et al.*, 1997; Strange, 2001; Tauscher *et al.*, 2004). Outros ainda consideram o particular efeito sobre o receptor serotoninérgico $5-HT_{2A}$, ou a uma razão inibitória aumentada entre $5-HT_{2A}/D_2$ (Meltzer *et al.*, 2003). Existe também uma teoria baseada em estudos de imagem sugerindo que os antipsicóticos atípicos bloqueiam seletivamente os receptores dopaminérgicos de forma mais representativa nas zonas límbicas que nas estriatais (Pilowsky *et al.*, 1997; Strange, 2001; Bressan *et al.*, 2003). O rápido desacoplamento dos antipsicóticos de segunda geração dos receptores D_2 quando comparado aos de primeira geração, também é postulado como um possível mecanismo responsável pela diferença entre as classes (Kapur & Seeman, 2001).

De fato, os antipsicóticos atípicos apresentam baixa incidência de sintomas extrapiramidais (Meltzer & Massey, 2011). Entretanto, outros efeitos colaterais são reportados com a sua utilização. Dentre estes destacam-se: aumento de peso, hiperglicemia, dislipidemia, diabetes e hipertensão arterial; componentes da síndrome metabólica (Kapur & Remington, 2001). Este cenário clínico é propício ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares, que elevam a mortalidade entre os pacientes e limitam a continuidade do tratamento (Pouzet *et al.*, 2003). Conseqüentemente, os efeitos adversos contribuem significativamente para a não adesão do paciente ao tratamento, aumentando as chances de reinternação (Lieberman *et al.*, 2005).

Considerando a importância terapêutica dos antipsicóticos atípicos, vários autores propuseram diferentes mecanismos responsáveis pela gênese destes efeitos colaterais. Sugere-se que a ação antagônica destes compostos sobre os receptores $5-HT_{2C}$, histaminérgicos H_1 (McIntyre *et al.*, 2001a; Morimoto *et al.*, 2001;

Taylor & McAskill, 2000; Wirshing *et al.*, 1999), adrenérgicos α_1 - ou α_2 (Hamann *et al.*, 2001; Heinonen *et al.*, 1999; Wellman *et al.*, 1993), ou ainda, a ação agonista sobre os receptores muscarínicos M_3 (Yamada *et al.*, 2001) podem estar relacionados ao ganho de peso por alterações no controle do metabolismo ou da saciedade (Baptista *et al.*, 2002; Casey & Zorn, 2001; McIntyre, Mancini & Basile, 2001).

Contudo, os efeitos colaterais dos antipsicóticos atípicos são variáveis entre os membros da classe (Lieberman *et al.*, 2005). Por exemplo, a ziprasidona, apesar do perfil farmacodinâmico similar aos outros fármacos atípicos, apresenta baixa incidência de discrasias metabólicas.

1.2 Obesidade, Esquizofrenia e os Antipsicóticos

Nos últimos anos, alguns estudos tem mostrado que há uma propensão natural dos pacientes esquizofrênicos em desenvolver obesidade e anomalias metabólicas independentemente do tratamento com antipsicóticos (Thakore, 2004). Todavia, Padmavati e colaboradores (2010) propõem o contrário; a doença não estaria relacionada ao aumento da prevalência de desordens metabólicas, mas sim as circunstâncias de vida de cada paciente (Padmavati *et al.*, 2010).

O aumento de peso durante o tratamento com antipsicóticos de segunda geração é variável entre os diferentes membros da classe. Em 10 semanas, a olanzapina induz ganho de peso aproximado de 4,15 kg. Enquanto, os pacientes tratados com ziprasidona apresentam aumento ponderal de 0,04 kg no mesmo período (Shobo *et al.*, 2011). Além disso, estudo recente de Wang e colaboradores (2011) mostrou que a ziprasidona, como um adjuvante, reduz o ganho de peso induzido por outros antipsicóticos (Wang PW *et al.*, 2011).

A prevalência de sobrepeso e obesidade vem aumentando progressivamente nos últimos anos, sendo considerado um problema de saúde pública na atualidade. Estimativa, em 2008, da Organização Mundial da Saúde destaca que mais de um bilhão e meio de indivíduos adultos estão acima do peso (World Health Organization, 2008).

Considerando a contribuição dos antipsicóticos no ganho de peso que pode levar à obesidade, torna-se importante que medicamentos com a mesma eficácia

terapêutica e com menores efeitos adversos concernentes à influência sobre o metabolismo sejam caracterizados.

1.3 Ziprasidona

A ziprasidona é um antipsicótico atípico recente, clinicamente efetivo no tratamento da esquizofrenia e psicose maníaco-depressiva e que atua sobre receptores serotoninérgicos, dopaminérgicos e adrenérgicos (Vogel *et al.*, 2009; Tandon *et al.*, 1997, Potkin *et al.*, 2005). Trata-se de uma piperazina benzotiazólica lipofílica (Figura 1), cujo metabolismo de primeira passagem pode gerar mais de 12 metabólitos, dos quais não há relato sobre quaisquer atividades farmacológicas.

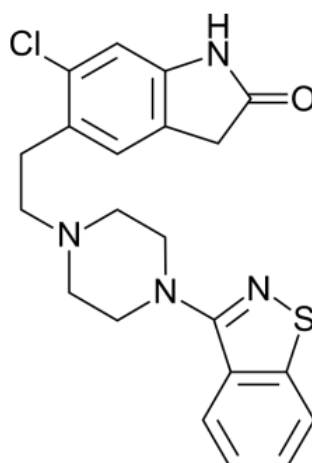


Figura 1: Estrutura molecular da ziprasidona.

Devido à lipofilicidade, sua absorção ocorre de maneira mais eficaz principalmente quando a administração é realizada em conjunto com alimentos ricos em gordura (Hamelin *et al.*, 1998). No Brasil, a ziprasidona (GEODON®, *Pfizer*) é comercializada tanto na apresentação oral (cloridrato de ziprasidona, comprimidos de 20, 40, 60 e 80 mg) quanto parenteral (mesilato de ziprasidona, 20 mg/ml, ampolas de 1ml) desde 2000 sob aprovação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA Resolução - RE nº 290, de 9 de novembro de 2000; ANVISA Resolução - RE nº 390, de 4 de dezembro de 2000). Os altos custos do tratamento limitam a sua utilização; cenário que provavelmente será alterado após expiração da patente prevista para este ano (2012).

Seu perfil farmacodinâmico caracteriza-se por potente antagonismo de receptores 5-HT_{2A}, sendo a afinidade pelos receptores serotoninérgicos maior quando comparada a receptores dopaminérgicos D₂ (Seeger *et al.*, 1995). Postula-se que o antagonismo dos receptores 5-HT_{2A} limita a ocorrência de efeitos extrapiramidais decorrentes da inibição de receptores D₂, bem como apresenta eficácia sobre os sintomas negativos da esquizofrenia como anedonia e isolamento social (Seeger *et al.*, 1995). Apresenta alta afinidade por receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{1D} e 5-HT_{2C} moderada inibição sobre a recaptção de serotonina (5-HT) e noradrenalina (NA) e antagonismo sobre receptores adrenérgicos α_1 (Rollema *et al.*, 2000). A ziprasidona apresenta ainda, menor afinidade por receptores histaminérgicos H₁ e muscarínicos M₁ quando comparada a outros antipsicóticos atípicos como clozapina, olanzapina e quetiapina (Pickar, 1995). A reduzida afinidade por receptores histaminérgicos e o agonismo sobre receptores 5-HT_{1A} conferem à ziprasidona um perfil farmacodinâmico diferenciado quando comparada aos outros antipsicóticos atípicos (Pickar, 1995; Rollema *et al.*, 2000).

No entanto, a ausência de alguns dos efeitos colaterais comuns aos antipsicóticos atípicos durante a utilização da ziprasidona não possui explicações farmacológicas bem determinadas até então. Uma grande dificuldade em determinar os mecanismos moleculares responsáveis pelo ganho de peso causado pelos antipsicóticos atípicos consiste na ausência de modelo experimental adequado (Minet-Ringuet *et al.*, 2006). Isto decorre da dificuldade na experimentação em humanos causada pelos múltiplos comportamentos e vias moleculares, às vezes redundantes, envolvidas. Somado a isso, os modelos animais, por vezes, não respondem de maneira congruente aos efeitos clínico-farmacológicos dos fármacos utilizados em humanos. A exemplo disso pode-se inferir o aumento de peso corporal em ratas fêmeas após o tratamento com ziprasidona, um resultado que difere quando o mesmo é realizado em animais machos (Kalinichev *et al.*, 2005, 2006). Estudo publicado por Snigdha e colaboradores mostrou que a olanzapina é capaz de aumentar a ingesta alimentar. Todavia este efeito pode ser anulado após associação com ziprasidona (Snigdha *et al.*, 2008).

Instigados pelas diferenças clínicas e farmacológicas da ziprasidona quando comparada aos outros antipsicóticos atípicos e, ainda, pela urgência em se conhecer mecanismos moleculares responsáveis pelo controle metabólico corporal, decidiu-se

investigar os efeitos da ziprasidona sobre o comportamento alimentar, metabólico e acúmulo lipídico no modelo invertebrado *Caenorhabditis elegans*.

1.4 O modelo *Caenorhabditis elegans*

O *Caenorhabditis elegans* é um pequeno nematódeo não-parasita encontrado no solo em várias regiões do mundo (Donald, 1997). Em 1963, foi proposto pelo pesquisador Sydney Brenner como organismo modelo para investigações sobre a biologia do desenvolvimento e organização de redes neuronais (Wood, 1988).

Inúmeros atributos morfológicos como pequeno tamanho (aproximadamente 1 mm quando adultos) e transparência, que proporciona a identificação de estruturas internas e marcações fluorescentes para microscopia, tornam o modelo atrativo para a pesquisa. Alimenta-se da bactéria *Escherichia coli*; apresenta ciclo de vida curto e prole numerosa (~ 300 por verme adulto) (Hope, 1999). Além disso, demanda cultivo fácil e pouco expensivo (Figura 2).

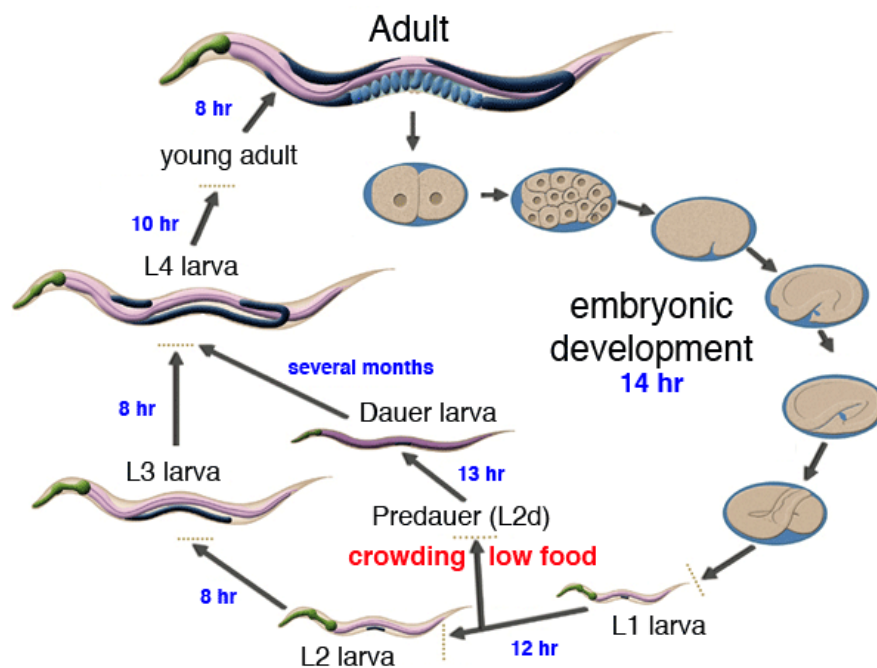


Figura 2: **Ciclo de vida do nematódeo *C. elegans***. Adaptado de Corsi AK, 2006.

Somado a isso, o genoma completamente sequenciado, linhagens celulares mapeadas, disponibilidade de mutantes para inúmeros genes e métodos genéticos

estabelecidos, incluindo transgenia e interferência por RNA, provem inúmeras opções para manipular e estudar o verme (Antoshechkin & Sternberg, 2007).

Após eclosão do ovo, o desenvolvimento processa-se em quatro estágios larvais (L1-L4). Atingida a fase adulta o verme é, no caso dos hermafroditas, capaz de se autofecundar. Frente às condições adversas de sobrevivência, como temperatura inadequada e carência de alimento, o nematódeo pode adentrar em estágio de “dormência” conhecido como larva *dauer*, o qual se caracteriza por alta resistência a estressores ambientais e longa sobrevivência (3 a 8 vezes o normal) (Riddle, 1988). Ainda, possui número constante de células, com desenvolvimento estereotipado (959 no hermafrodita adulto e 1.031 no macho adulto) (Sulston & Hodgkin, 1988). Os dois gêneros sexuais, hermafrodita e macho, diferenciam-se pelo número de células, variabilidade cromossômica (hermafroditas: 5 autossomos + XX; macho: 5 autossomos + XO) e proporção na população selvagem (predominantemente hermafroditas).

O verme foi o primeiro organismo multicelular a ter o genoma sequenciado (The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998) e, curiosamente, apresenta homologia genética variando entre 60-80% com genes dos mamíferos.

O verme adulto é cilíndrico, não segmentado, composto externamente de cutícula, hipoderme, sistema excretório, neurônios e músculos; e internamente por faringe, intestino e gônadas (<http://www.wormatlas.org>). De todos os sistemas, o mais complexo e excepcionalmente bem definido é o neuronal no qual 302 células (os machos possuem 89 células neurais adicionais) estão envolvidas em cerca de 5.000 sinapses e determinam diversos comportamentos. O verme utiliza pequenas moléculas neurotransmissoras como acetilcolina (ACh), ácido γ -aminobutírico (GABA), óxido nítrico (NO), glutamato e as aminas biogênicas octopamina (OA), tiramina (TA), 5-HT e dopamina (DA) (Brownlee & Fairweather, 1999).

Dentre as inúmeras funções das monoaminas, destaca-se a influência da 5-HT na estimulação da ovoposição e batimento faríngeo (Horvitz *et al.*, 1982). Além disso, a 5-HT cumpre papel regulatório sobre o metabolismo, o qual será focado nos tópicos abaixo. Distintamente, a exposição ectópica à OA, equivalente da NA nos invertebrados, causa movimentos de locomoção alterados e reduz o batimento faríngeo, ovoposição e defecação (Horvitz *et al.*, 1982). A TA é, quando administrada exogenamente, capaz de reverter o aumento dos batimentos faríngeos induzido pela 5-HT, bem como reduzir a ovoposição e influenciar no movimento

exploratório (Alkema *et al.*, 2005). Somado a estas, a DA modula a plasticidade comportamental através do controle da área de movimento exploratório, bem como, da frequência em que os vermes retornam para a bactéria após entrarem em uma região da placa desprovida de alimento (Hills *et al.*, 2004). A DA também inibe a locomoção e a ovoposição (Horvitz *et al.*, 1982).

1.5 C. elegans e o metabolismo de lipídios

A conservação das vias do metabolismo lipídico e a possibilidade de estudá-las tem popularizado este modelo para estudos que exploram o perfil lipídico frente a alterações genéticas e resposta ao tratamento com diversas substâncias (Watts, 2009). O *C. elegans* não possui tecido de armazenamento lipídico específico como o adiposo nos mamíferos. Os lipídios são armazenados como triacilgliceróis (TGA) em gotículas lipídicas localizadas principalmente nas células intestinais, hipoderme e gônadas. Esta gordura é proveniente tanto da alimentação quanto da síntese *de novo*. Diferentemente dos mamíferos, a síntese de colesterol não é realizada pelo *C. elegans*, necessitando de suplementação exógena (Kurzchalia & Ward, 2003). As células intestinais são do tipo epitelial colunar polarizada, com a membrana apical voltada para o lúmen intestinal. Estas são responsáveis pela secreção de lipases e peptidases digestivas, além de apresentarem superfície rica em microvilosidades que contribuem para a absorção de nutrientes (Mullaney & Ashrafi, 2009). A entrada de ácidos graxos nas células pode ocorrer tanto através de difusão pela membrana celular quanto por transporte ativo. Nos mamíferos, os ácidos graxos de cadeia longa são captados por transporte ativo com o auxílio das proteínas transportadoras de ácidos graxos (FATPs) e CD36, ambas com ortólogos presentes no *C. elegans* (proteínas hipotéticas representadas respectivamente pelos seguintes códigos: F28D1.9, D1009.1 e Y49E10.20, Y76A2B.6). As proteínas ligantes de ácidos graxos (FABPs) e ligantes de acil-CoA (ACBP) também possuem papel importante na captação e transporte de ácidos graxos. Destas proteínas, pelo menos 9 membros da família FABP (*LBP-1* a *LPB-9*, *EEED8.3*) e 7 membros da família ACBP (*ACBP1*, *ACBP-3* a *ACBP-7*), sendo uma ACBP associada à membrana (*MAA-1*), estão conservadas no *C. elegans* (Mullaney & Ashrafi, 2009). Por outro lado, as lipoproteínas presentes nos mamíferos não possuem ortólogos no verme. Os lipídios são distribuídos internamente por vitelogeninas (VIT-1 a VIT-6) que compõe o vitelo,

nutriente fundamental para o desenvolvimento gonadal (Kimble *et al.*, 1983). A síntese e modificações nos lipídios ocorrem principalmente no intestino (Branicky *et al.*, 2010). As enzimas acetilcoenzima A carboxilase (ACC) e ácido graxo sintase (FAS) produzem o ácido palmítico (16:0) que sofre a ação de sete ácido graxo dessaturases (FAT-1 a FAT-7), uma 3-cetoacilCoA redutase (LET-767) e duas ácido graxo elongases (ELO-1 e ELO-2), transformando-se em uma ampla gama de ácidos graxos poliinsaturados (PUFAS). A síntese de ácidos graxos ramificados ocorre a partir de cadeia ramificada coenzima A (CoA) primária por elongases especializadas (ELO-5 e ELO-6). Além disso, o *C. elegans* é capaz de sintetizar ácido linoléico (18:2n6) e linolênico (18:3n3) diferentemente dos mamíferos (Watts, 2009) (Figura 3).

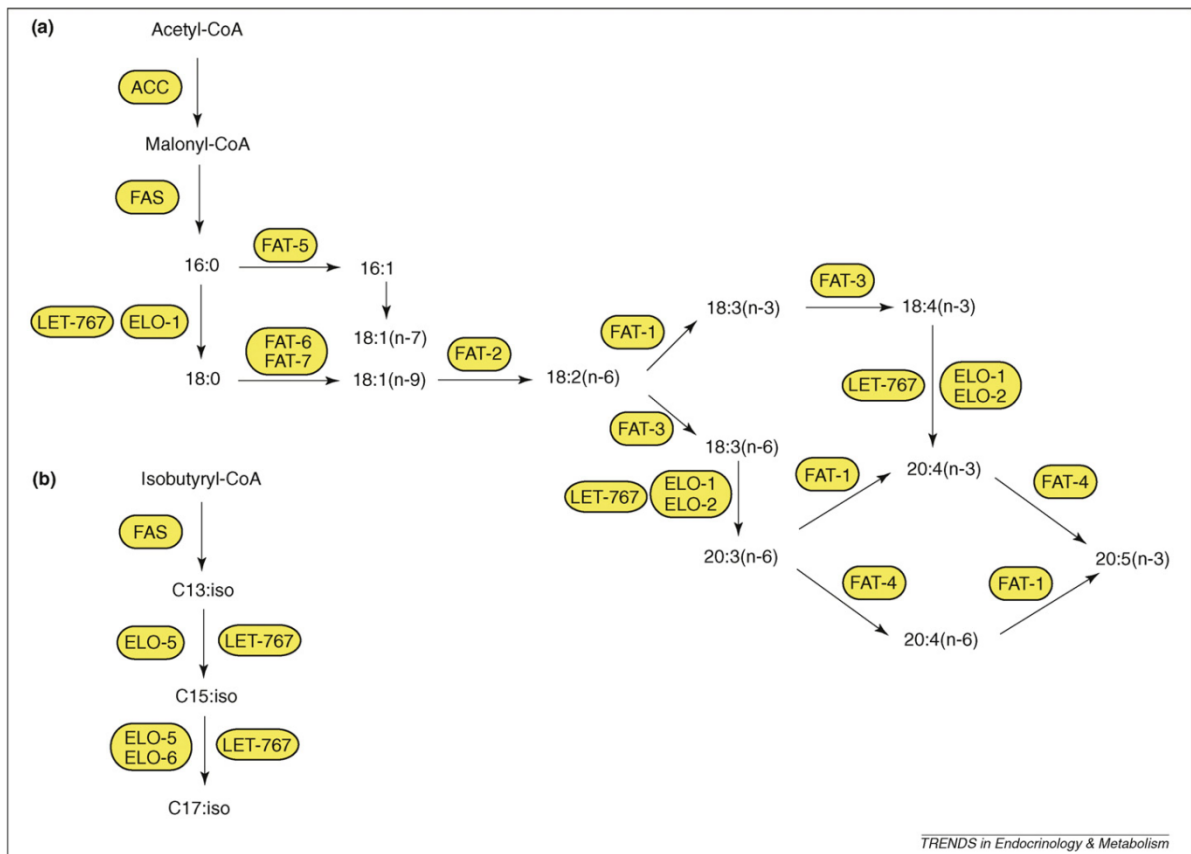


Figura 3: Via de síntese de ácidos graxos no nematódeo *C. elegans*. Adaptado de Watts JL, 2009.

O catabolismo de ácidos graxos constitui na principal forma de fornecimento de energia, ocorrendo nas mitocôndrias e nos peroxissomos (Reddy & Hashimoto, 2001). Estudos mostram a conservação de genes codificantes de inúmeras enzimas lipases envolvidas neste processo no verme (Mak *et al.*, 2006; Van *et al.*, 2005). No

entanto, apenas algumas foram estudadas quanto ao papel metabólico no nematódeo (K04A8.5, K08B12.1, ATGL-1, HOSL-1, LIPS-7, FIL-1, FIL-2, and F01G10.7) (Elle *et al.*, 2010). Durante episódios de restrição alimentar, ocorre a ativação de enzimas lipases, FIL-1 e FIL-2 (Jo *et al.*, 2009). Já quanto as lipases K04A8.5 e LIPS-7, estudos mostram que a ativação pode ocorrer mesmo em estado alimentado mas frente a translocação de DAF-16 para o núcleo (Elle *et al.*, 2010). Estas enzimas iniciam a liberação de ácidos graxos dos TGA por meio de hidrólise, os quais, após uma série de reações, irão formar acetil-CoA utilizado para gerar energia (Salway & Granner, 2004).

1.6 Vias de regulação do metabolismo lipídico no *C. elegans*

Recentemente, muitos trabalhos mostraram que a regulação do perfil lipídico no *C. elegans* dá-se por intermédio de alguns genes, bem como por influência neuroendócrina (Elle *et al.*, 2008). Ashrafi e colaboradores (2003), após *screening* com RNA de interferência, identificaram 305 genes relacionados à redução dos depósitos de gordura e 112 gerando aumento do acúmulo lipídico após redução da expressão gênica (Ashrafi *et al.*, 2003). Recentemente, um novo *screening* com RNA de interferência utilizando o método de quantificação de lipídios sem marcação através de espalhamento Raman estimulado detectou novos genes responsáveis pelo controle de acúmulo lipídico (Wang MC *et al.*, 2011). Um dos responsáveis pelo controle lipídico no *C. elegans* é o fator de crescimento semelhante à insulina (*insulin/IGF-I like*). Quando as condições ambientais estão propícias ao crescimento e reprodução, o receptor de insulina (DAF-2) é ativado por ligantes insulina-*like*; isto ativa a enzima *fosfoinositol-3-quinase* (AGE-1) que gera fosfoinositol-trifosfato (PIP3) e recruta *AKT-1*, *AKT-2*, *SGK-1* e *PDK-1* para a membrana plasmática. Por fim, esta cascata de fosforilações resulta na fosforilação e inativação por sequestro citoplasmático de DAF-16, ortólogo do fator de transcrição "*Forkhead*" da família da FoxO, impedindo a transcrição de genes sob seu controle (Dorman *et al.*, 1995, Gami *et al.*, 2006; Lin K *et al.*, 2001; Ogg *et al.*, 1997; Paradis & Ruvkun, 1998; Kimura *et al.*, 1997) (Figura 4).

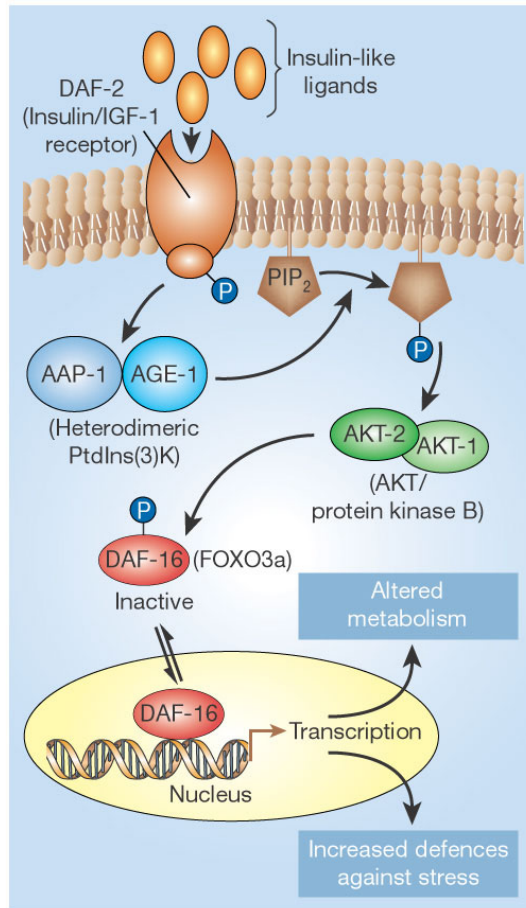


Figura 4: Via de sinalização por DAF-16 em *C. elegans*. Adaptado de Nemoto & Toren Finkel, 2004.

Estudos tem mostrado que frente a uma perda no DAF-2, observa-se acúmulo lipídico em vermes no estágio larval L4, o que se deve ao aumento na síntese *de novo* e na captação de ácidos graxos (Perez & Van Gilst, 2008; Kimura *et al.*, 1997). Este aumento na captação ainda pode ser devido a uma redução na expressão do gene *pept-1* (codificador do transportador de peptídeo acoplado a proteína), o qual afeta negativamente a captação de ácidos graxos (Spanier *et al.*, 2009) e é regulado por DAF-16 (Kage-Nakadai *et al.*, 2010)

Este fator de transcrição induz acúmulo de gordura e suprime a lipólise na larva *dauer*; fenótipo este observado na ausência de alimento (Ashrafi *et al.*, 2003; Murphy *et al.*, 2003; Narbonne & Roy, 2009).

A 5-HT também desempenha papel importante no controle do metabolismo lipídico no *C. elegans*. A síntese da mesma ocorre a partir do aminoácido triptofano,

o qual sofre a ação da enzima triptofano hidroxilase (TPH-1) e posteriormente de uma descarboxilase de aminoácidos aromáticos (BAS-1), formando a 5-hidroxitriptamina ou serotonina. No *C. elegans*, sua liberação ativa receptores serotoninérgicos acoplados a proteína G. As proteínas G classificam-se de acordo com a estrutura e sequência da subunidade α , sendo que as três principais isoformas são a Gs, a Gq e a Gi. A proteína Gs (estimulatória), que ativa a enzima adenilato ciclase, a qual encontra-se aderida à membrana plasmática e catalisa a formação de 3'-5' adenosina monofosfato cíclico (AMPc) a partir do trifosfato de adenosina (ATP) sendo relacionada com o aumento da resposta celular. Por outro lado, a proteína Gi (inibitória) inibe a atividade desta enzima e sinaliza a diminuição da resposta celular. A proteína Gq está envolvida na ativação da enzima fosfolipase C, que assim como a adenilato ciclase participa da formação de segundos mensageiros. Depois da ativação, ela degrada o fosfatidil inositol 4,5 bifosfato (PIP2) presente na membrana em 1,4,5 trifosfato de inositol (IP3) e 1,2 diacilglicerol (DAG). Pelo menos cinco receptores já foram identificados no nematódeo *C. elegans*: SER-1 (ortólogo ao receptor 5-HT₂ humano, acoplado à proteína Gq), SER-4 (ortólogo ao receptor 5-HT₁, proteína Gi), SER-6 (proteína Gs) e SER-7 (ortólogo ao receptor humano 5-HT₇, proteína Gs). O *C. elegans* apresenta também o gene *mod-1*, codificante para o receptor de 5-HT acoplado a canal de cloreto e *mod-5* para o transportador de 5-HT dependente de Na⁺/Cl⁻ (Carre-Pierrat *et al.*, 2006; Dernovici *et al.*, 2007; Hobson *et al.*, 2003; Ranganathan *et al.*, 2000). Alguns trabalhos tem demonstrado que vermes incapazes de sintetizar 5-HT por prejuízo na função de *tph-1* apresentam reduzida taxa de alimentação e acúmulo lipídico (Ashrafi *et al.*, 2003; Sze *et al.*, 2000). Por outro lado, a administração exógena de 5-HT causa efeitos inversos, ou seja, aumenta na taxa de alimentação e redução das reservas lipídicas. Isto reforça a importância desta monoamina no metabolismo de lipídios no nematódeo *C. elegans* (Srinivasan *et al.*, 2008).

O acúmulo e utilização da gordura no *C. elegans* é dependente também da proteína ativada por AMP, quinases alvo-da-rapamicina (TOR), fatores de transcrição como a proteína de ligação ao elemento de resposta ao esteroide (SREBP), proteínas ligantes ao amplificador CCAAT (C/EBP), fator de transcrição *Krüppel-like* e proteína ligante ao elemento de resposta do AMP (CREB) (Long *et al.*, 2002; McKay *et al.*, 2003; Apfeld *et al.*, 2004; Jia *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2006, Zhang *et al.*, 2009). Já foi evidenciado que a ausência de alimento ativa CREB (Suo

et al., 2006). Aliado a isso, a família dos receptores nucleares de hormônios (NHR) também está relacionada ao metabolismo de lípidos, já que a redução da expressão ou deleção do gene *nhr-49* eleva a quantidade de gordura estocada no animal (Ashrafi *et al.*, 2003; Van Gilst *et al.*, 2005).

A ausência de explicações que associem a atuação da ziprasidona sobre o controle metabólico através da via serotoninérgica, por exemplo, ou de outros genes ainda indeterminados nos levou a estudar mais profundamente os mecanismos moleculares deste fármaco em um modelo detentor de inúmeras vantagens

2 Objetivo

2.1 Objetivo geral

O objetivo deste estudo foi verificar os possíveis efeitos do antipsicótico atípico ziprasidona sobre o comportamento e acúmulo lipídico no nematódeo *Caenorhabditis elegans*.

2.2 Objetivos específicos

- Estudar o comportamento do nematódeo *C. elegans* frente ao tratamento com ziprasidona através dos testes de batimento faríngeo, ciclos de defecação e movimento (distância percorrida, aceleração e velocidade).
- Verificar os efeitos da ziprasidona sobre a capacidade reprodutiva, tanto na postura de ovos quanto na produção de ovos.
- Determinar as reservas lipídicas e possíveis alterações deste parâmetro induzidas por ziprasidona no *C. elegans*.
- Observar possíveis alterações no desenvolvimento induzidas por ziprasidona.
- Verificar os mecanismos moleculares envolvidos na ação da ziprasidona sobre possíveis alterações no metabolismo lipídico no verme.

3 Materiais e Métodos

3.1 Condições de cultura e manutenção

Os vermes selvagem e mutantes foram adquiridos do *Caenorhabditis Genetics Center* (CGC – *University of Minnesota*), exceto a cepa KQ1038 cedida gentilmente pelo laboratório do Prof. Kaveh Ashrafi (*University of California - San Francisco*). Todas as cepas foram avaliadas quanto à presença da mutação de interesse, através de reação em cadeia da polimerase (PCR) para o segmento mutado nos laboratórios de origem. A cepa selvagem utilizada foi N2 variante Bristol. As cepas mutantes utilizadas neste estudo estão listadas na Tabela 1.

MAMÍFERO	<i>C. elegans</i>	CÓDIGO DA CEPA	CARACTERÍSTICAS	OUTCROSSED
5-HT ₁	<i>Ser-4</i>	RB745	Receptor de serotonina(Gi)	X0
5-HT ₂	<i>Ser-1</i>	DA1814	Receptor de serotonina(Gq)	X10
5-HT ₇	<i>Ser-7</i>	DA2100	Receptor de serotonina(Gs)	X10
	<i>Ser-3</i>	RB1622	Receptor de serotonina/octopamina(Gs)	X0
	<i>Ser-6</i>	KQ1048	Receptor de serotonina(Gs)	
	<i>Mod-1</i>	MT9668	Receptor de serotonina acoplado ao canal de cloreto	X6
TPH-1	<i>Tph-1</i>	GR1321	Enzima triptofano hidroxilase	X4
	<i>Mod-5</i>	MT8944	Transportador de 5-HT dependente de Na ⁺ , Cl ⁻ (captação de 5-HT)	X2
DAF-16	<i>Daf-16</i>	CF1038	Homólogo de FOXO	X11
CREB	<i>Crh-1</i>	YT17	Fator de transcrição	X6

Tabela 1: **Cepas mutantes de *Caenorhabditis elegans* utilizadas nos experimentos.** A primeira coluna mostra os genes ortólogos nos mamíferos e a segunda a nomenclatura do gene no verme. O código da cepa é a numeração utilizada para identificar o mutante. A quinta coluna mostra o número de vezes que o mutante foi cruzado com o selvagem (N2). Dados retirados do “*The Caenorhabditis Genetics Center*” (CGC, <http://www.cbs.umn.edu/CGC/>) ou do laboratório de origem da cepa.

Os vermes foram mantidos em condições-padrão de cultura, em placas de cultivo contendo meio de crescimento para nematódeos (NGM: 3 g/L NaCl; 17 g/L ágar; 2,5 g/L peptona; 1 mM CaCl₂; 5 mg/L colesterol; 1 mM MgSO₄; 25 mM KPO₄⁻²)

(Brenner, 1974), a 20 °C e supridos nutricionalmente com bactéria *Escherichia coli* cepa OP50.

Para os experimentos, os vermes foram sincronizados através do método do hipoclorito para a obtenção de população na mesma fase larval. Animais saudáveis foram coletados em tubos de 15 mL. Após lavar uma vez com H₂O_{dd} (5,85 g/L NaCl; 1 g/L K₂HPO₄; 6 g/L KH₂PO₄; 5 mg/L colesterol) e centrifugar (350 g por 3 minutos) para sedimentação dos vermes, foram adicionados 5 mL de solução de sincronização (3,75 mL H₂O_{dd}; 250 µL 10 N NaOH; 1 mL hipoclorito de sódio 2%). A lise dos vermes foi monitorada através de microscopia e, após a ruptura de aproximadamente 50% dos animais, os tubos foram preenchidos com tampão M9 (3 g/L KH₂PO₄; 6 g/L Na₂HPO₄; 5 g/L NaCl; 1M MgSO₄) para parar a reação e, em seguida, centrifugados. O *pellet* formado pelos vermes foi lavado três vezes com tampão M9 e estes transferidos para uma placa de petri contendo 10 mL de tampão M9. Este procedimento mata os vermes em todos os estágios larvais ou adulto, mas preserva os ovos que são resistentes a solução de sincronização (não excedendo 5 minutos). Os ovos foram mantidos a 20 °C até eclodirem (12-14 h após). Devido a ausência de alimentos, os vermes param o seu desenvolvimento no estágio larval L1 e foram assim utilizados para os experimentos.

3.2 Tratamento com ziprasidona

A ziprasidona (Toronto Research Chemicals) foi dissolvida previamente em dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma) e armazenada. Para evitar a precipitação da mesma, diluímos o volume necessário de ziprasidona ou DMSO (veículo controle) em ácido acético (1:10.000). Esta solução foi então adicionada ao NGM ainda não solidificado e distribuída em placas com o volume de 3 mL.

A partir dos resultados obtidos através de curva dose-resposta, escolhemos a concentração de 40 µM visto que o composto foi efetivo em reduzir a fluorescência do marcador lipídico *Nile Red* como poderá ser visto nos resultados abaixo. Outro fator cuidadosamente observado foi a concentração de DMSO. Esta substância é pouco tolerada pelo verme e foi mantida em um nível máximo de 0,16%.

Após a solidificação das placas, semeamos a bactéria (150 µL) (*E. coli*, OP50) e deixamos crescer por 24 h (20-22 °C). Animais no estágio larval L4 foram mantidos sob tratamento por 24 h quando então as análises experimentais foram executadas

3.3 Tratamento com aminas exógenas

Dopamina (Hidroclorato de dopamina, Sigma–H8502), tiramina (Hidroclorato de tiramina, Sigma–T2879), serotonina (Hidroclorato de serotonina, Sigma-H9523) e octopamina (hidroclorato de octopamina, Sigma–O0250) foram dissolvidas em 0,1 M HCl. Todas as soluções foram preparadas e adicionadas nas placas controle ou teste nas condições determinadas. Utilizamos três controles para posteriores comparações: DMSO (0,16%), 0,1 M HCl ou DMSO + 0,1 M HCl. Vermes em estágio larval L4, provenientes de placas contendo o marcador *Nile Red*, foram transferidos para as placas controle, contendo monoaminas, com e sem a adição de ziprasidona.

3.4 Perfil lipídico através de marcadores fluorescentes

Para a marcação lipídica com os corantes vitais *Nile Red* e BODIPY ((C11-BODIPY-C12) Invitrogen) seguimos protocolo previamente estabelecido (Ashrafi *et al.*, 2003; Mak *et al.*, 2006). Os vermes sincronizados foram expostos ao *Nile Red* (Sigma – N3013) a partir do estágio larval L1 até adulto. A solução estoque de *Nile Red* (em acetona) foi diluída em tampão M9 na concentração final de 50 ng/mL e adicionadas em placas contendo NGM e bactéria *E. coli* (150 µL para um volume final de 3 mL em cada placa). O ácido graxo conjugado com o fluoróforo BODIPY (C11-BODIPY-C12) (concentração final 0,25 µM, volume final na placa de 3 mL) foi previamente diluído em tampão M9 contendo albumina de soro bovino (BSA, 20 µM) e então colocado sobre as placas. Após o tratamento, os vermes foram retirados das placas por lavagem com tampão M9, deixados precipitar, colocados sobre lâminas contendo tapete de agarose a 2% para evitar alterações morfológicas, paralisados com 10 µL de azida (NaN₃, 50 mM) e cobertos com lamínula. As imagens foram adquiridas em Zeiss Axioplan II, acoplado à câmera CCD, e filtros de fluorescência adequados (número dos filtros) (*Nile Red*: 540 a 552 nm, emissão maior que 590 nm; BODIPY: excitação 395 a 440 nm, emissão maior que 470 nm). Para redução do ruído as imagens com o marcador *Nile Red* foram feitas utilizando a função APOTOME que possibilitou secções ópticas de 2.52 µm (em média 13 secções/verme). Já para a marcação por BODIPY, as imagens foram adquiridas sem a função APOTOME em plano único por facilidade de execução.

Utilizamos também o marcador *LipidTox Green* (Invitrogen – H34476) seguindo protocolo prévio com algumas alterações (O'Rourke *et al.*, 2009). Animais foram retirados das placas por lavagem com tampão M9, lavados quatro vezes para eliminação das bactérias, transferidos para um tubo de 1,5 mL e fixados com 1 mL de solução de fixação (0,2x PBS (8 g/L NaCl; 0,2 g/L KCl; 1,44 g/L Na₂HPO₄; 0,24 g/L KH₂PO₄ (pH 7,4)) 2% Paraformaldeído; 1x MWRB modificado (80 mM KCL; 40 mM NaCl; 20 mM EGTA; 10 mM, Espermidina; 15 mM PIPES)) por 30 minutos, à temperatura de 22 °C. Posteriormente, os vermes foram lavados duas vezes com 1 mL de 100 mM Tris-HCl (pH 7,5) e incubados por 30 minutos em 1 mL de solução de redução (1,54 mg/mL de DTT; 100 mM Tris-HCl (pH 7,5)) à temperatura de 22 °C. Após a última incubação, os vermes foram lavados duas vezes em PBS. Após a lavagem adicionamos PBS para um volume final de 1 mL, neste foi adicionado 2 µL de solução de *LipidTox Green* 500x. Os tubos foram protegidos da luz com alumínio e incubados durante a noite. Os animais foram montados em lâmina com tapete de agarose 2% e as imagens adquiridas em microscópio confocal Leica SP5, utilizando configurações idênticas (laser de argônio; excitação 488 nm, AOTF 488/543/633, PMT-1 emissão 500-530 nm; objetiva 63x NA 1.4 imersão a óleo). Realizamos séries Z com espessura de 2 µm (aproximadamente 10-15 fatias por verme). A próxima etapa foi somar todos os cortes ópticos e quantificar a fluorescência da primeira metade da distância entre o início do intestino e a vulva. Esta área normalmente engloba os três primeiros pares de células intestinais e tem sido utilizada na literatura para a quantificação lipídica através destes marcadores (Ashrafi, 2007).

Ressaltamos que os experimentos foram realizados pelo menos duas vezes em dias distintos.

3.5 Ensaio de batimento faríngeo

O ensaio seguiu protocolo baseado na literatura (Wang *et al.*, 2008). O batimento faríngeo foi avaliado à temperatura de 22 °C, em animais saudáveis expostos por 24 h ao controle (DMSO) ou ziprasidona (40 µM) sobre o tapete de bactérias. O número de contrações do bulbo posterior da faringe de cada verme foi contado por um período de 10 segundos, em triplicata, e a média multiplicada por

seis, resultando no número de contrações/minuto. Todos os experimentos foram repetidos pelo menos duas vezes em dias separados.

3.6 Ensaio de movimento

O protocolo corrente na literatura foi adaptado para o “*setup*” de microscopia do laboratório (Ramot *et al.*, 2008). Animais foram transferidos individualmente para novas placas semeadas com 100 μ L de bactéria, contendo veículo ou ziprasidona (40 μ M). Após período de adaptação de 10 minutos, foram filmados durante um minuto, por câmera CCD, ajustada à velocidade de ~12 imagens/segundo, acoplada ao estereoscópio em aumento de 40x (Nikon SMZ 1500 Stereoscope microscope). A distância percorrida, velocidade média e aceleração média dos vermes foram determinadas através da função de rastreamento do programa de análise da Nikon (NIS-Elements AR 3 (Nikon)). Os experimentos ocorreram à temperatura de 22 °C e foram repetidos duas vezes em dias separados.

3.7 Ensaio de defecação

O comportamento foi analisado através de protocolo previamente estabelecido (Wang *et al.*, 2008). Os animais foram monitorados sobre o alimento. A defecação de cada verme foi obtida nos três intervalos entre os ciclos. O ciclo de defecação foi identificado pelo padrão estereotipado de contração peristáltica que ocorre no intestino do animal seguida da expulsão das fezes. Para cada verme foram realizadas medições de três intervalos de defecação e a média desses intervalos foi utilizada para posteriores comparações entre os grupos. Os experimentos foram realizados à temperatura de 22 °C e repetidos duas vezes em dias diferentes.

3.8 Ensaios de reprodução

A reprodução foi avaliada através de ensaios estabelecidos na literatura (Wang *et al.*, 2008; Schafer & Kenyon, 1995). Foram utilizados animais grávidos, bem alimentados, tratados com veículo ou ziprasidona (40 μ M) por 24 h. O número de ovos dentro do útero foi determinado através da contagem após lise individual

dos vermes com solução de sincronização. A taxa de ovoposição foi determinada pela transferência de um verme grávido para nova placa contendo o mesmo tratamento de origem por intervalo de duas horas. O verme foi então retirado e, no dia seguinte, o número de larvas presentes na placa contado. Os resultados foram expressos em média de ovos postos por verme por hora. Os experimentos foram realizados à temperatura de 22 °C e repetidos pelo menos duas vezes em diferentes ocasiões.

3.9 Avaliação do desenvolvimento larval e tamanho

Para determinar se a ziprasidona causa alterações no desenvolvimento do verme, nematódeos selvagens sincronizados foram monitorados do estágio larval L1 até adulto sobre placas de NGM semeadas com *E.coli* (OP50) contendo ziprasidona (40 µM) ou veículo. Durante as observações, os vermes foram mantidos a 20 °C ± 2 e monitorados a cada 12 horas (Lin *et al.*, 2006). As larvas foram classificadas em L1, L2, L3, L4 e adulto grávido. Para isto, alguns parâmetros como tamanho, desenvolvimento da vulva e presença de ovos foram considerados. O tamanho do corpo foi avaliado após tratamento com ziprasidona (40 µM) ou veículos (DMSO 0.16% em ácido acético (1:10 000)) a partir do estágio larval L4 por 24 h, 48 h e 72 h. Os vermes foram retirados das placas e colocados em lâminas contendo tapete de agarose (2%), fotografados através de câmera acoplada ao estereoscópio em aumento de 40x (Nikon SMZ 1500 Stereoscope microscope). O corpo de cada verme foi individualmente circundado para a quantificação do perímetro (em µm) através do programa NIS-Elements AR 3 (Nikon)®.

3.10 Análise de imagens e estatística

O programa ImageJ (NIH) foi utilizado para análise das imagens e densitometria. As análises estatísticas e os gráficos foram feitos utilizando o software GraphPad Prism 5®. A verificação de significância da diferença entre as médias foi feita através do test-t de Student ou da análise de variância (ANOVA) de uma via seguida do teste de Bonferroni ou ANOVA de duas vias quando apropriado.

4 Resultados

4.1 Perfil lipídico frente ao tratamento com o antipsicótico ziprasidona

Inicialmente, avaliamos o perfil lipídico de vermes selvagens expostos à diferentes concentrações de ziprasidona. Baseados em concentrações utilizadas em outros trabalhos com antipsicóticos em *C. elegans* (Donohoe *et al.*, 2009), analisamos os efeitos de diferentes concentrações de ziprasidona sobre o acúmulo de fluorescência por *Nile Red* (Figura 5).

Verificou-se uma redução significativa de 23% na fluorescência do marcador *Nile Red* após tratamento de 24 h (L4 até adulto) a partir de 10 μM ($p < 0.01$). Escolhemos a concentração de 40 μM (20-35% de redução) para as próximas avaliações.

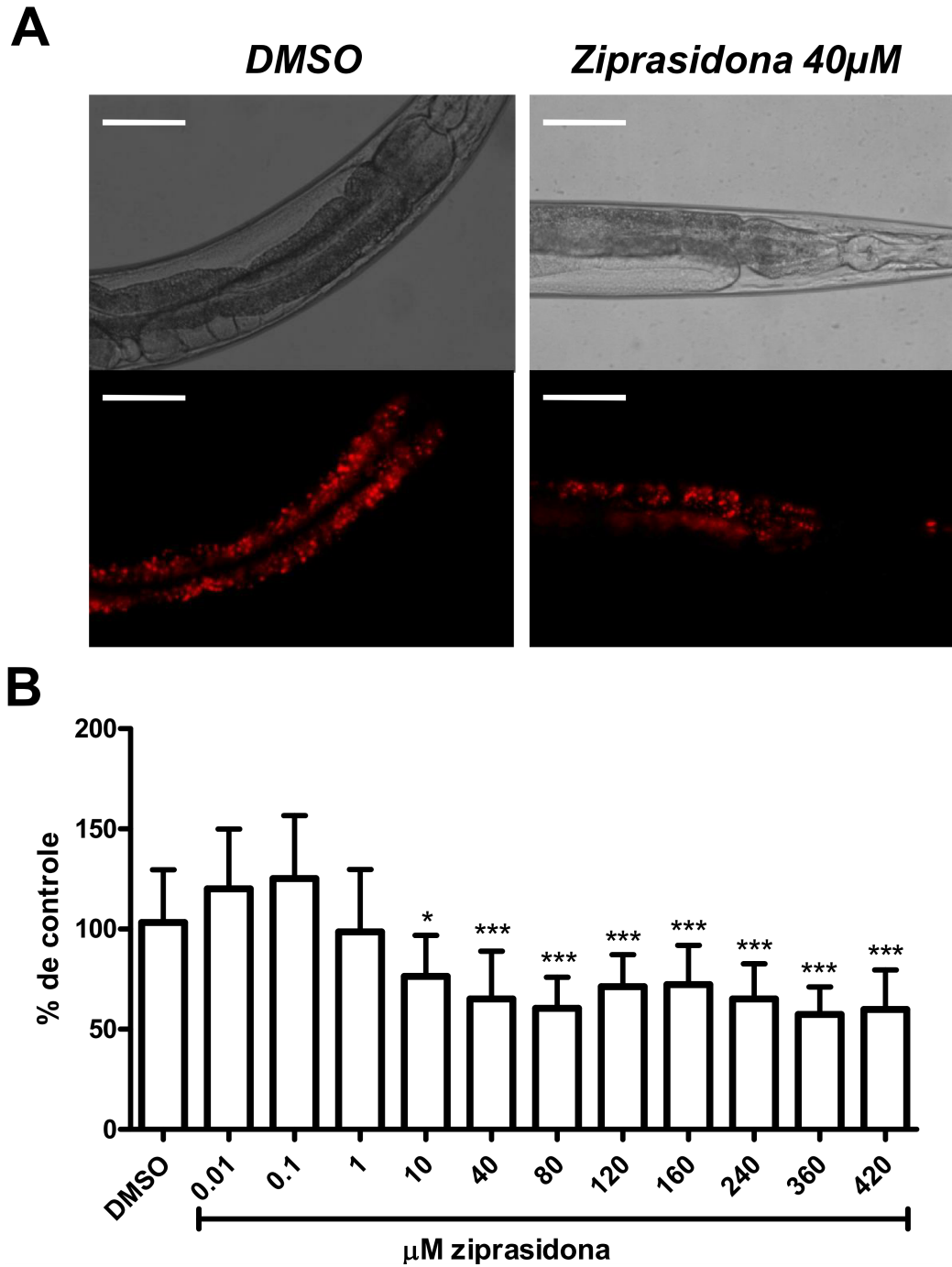


Figura 5: **Redução da Fluorescência do marcador Nile Red após tratamento com ziprasidona por 24 h em vermes selvagens (N2).** (A) Imagens representativas do tratamento com ziprasidona; (B) curva de dose-resposta para ziprasidona. O tratamento com ziprasidona (40 µM) ou veículo (DMSO 0.16% em ácido acético (1:10 000)) iniciou-se no estágio larval L4 e transcorreu por 24 h até a fase adulta. Cortes ópticos de 2.52 µm foram somados para a quantificação da fluorescência de Nile Red nos primeiros pares de células intestinais. Os resultados foram expressos em porcentagem do

controle (média de fluorescência, desvio padrão (DP), $n > 15$); * $p < 0.05$; *** $p < 0.0001$, quando comparado ao controle (DMSO) por ANOVA de uma via seguido por teste *post hoc* de Bonferroni.

A redução lipídica inferida pela redução da fluorescência do marcador *Nile Red* foi confirmada através de dois outros marcadores fluorescentes de TGA: BODIPY (Figura 6A e 6B, $p < 0.001$, redução de aproximadamente 32%) e *LipidTox Green* (Figura 6C e 6D, $p = 0.01$, redução de ~23%)

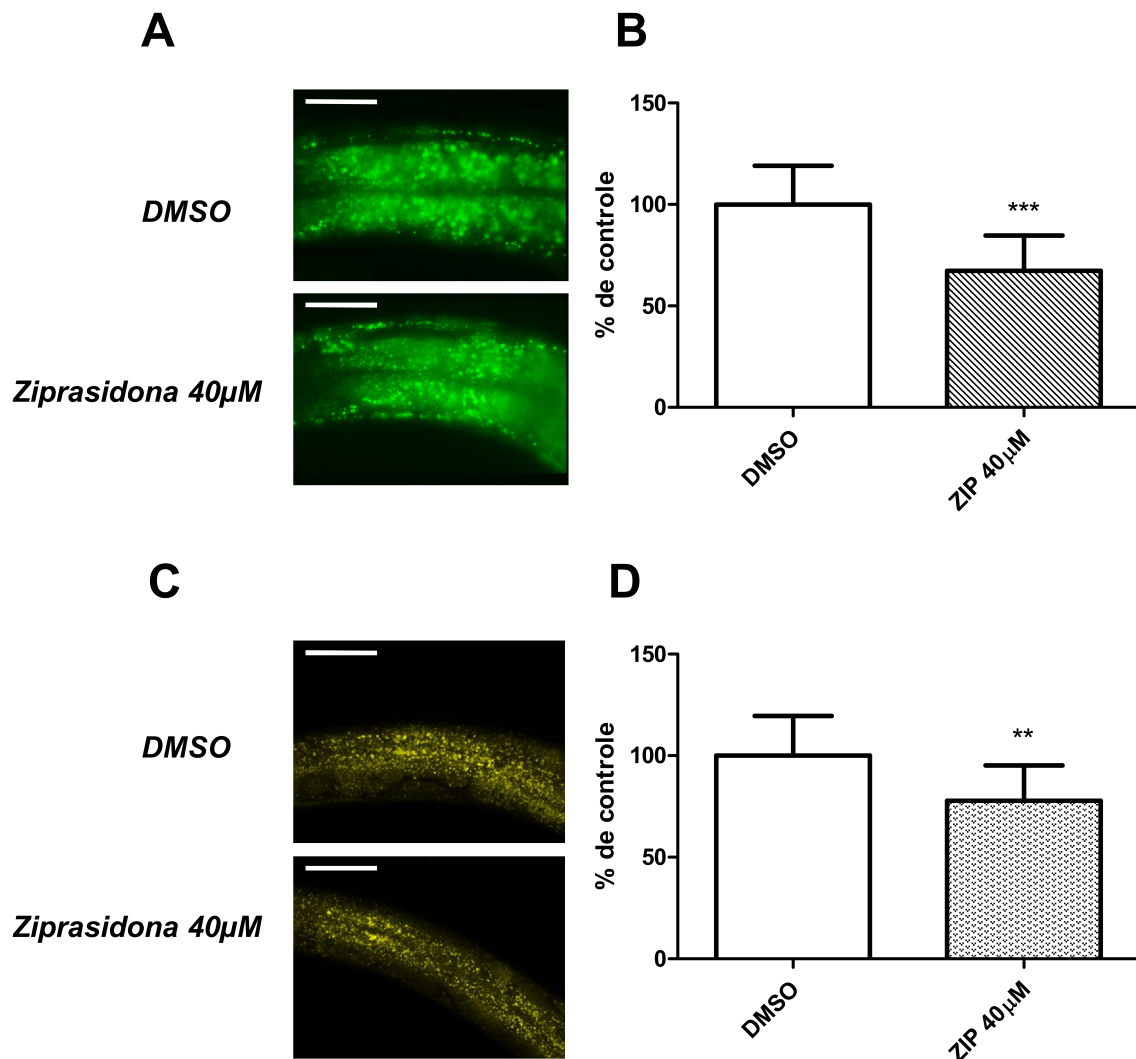


Figura 6: **Redução da Fluorescência induzida pelo tratamento com ziprasidona por 24 h em vermes *Caenorhabditis elegans* selvagens (N2) evidenciada pelos marcadores BODIPY e *LipidTox*.** (A) Imagens representativas das reservas lipídicas evidenciadas pelo marcador BODIPY e (B) quantificação da fluorescência; (C) Imagens representativas e (D) quantificação densitométrica resultante da marcação lipídica pelo fluoróforo *LipidTox Green*. O tratamento com ziprasidona (40 µM) ou veículo (DMSO 0.16% em ácido acético (1:10 000)) iniciou-se no estágio larval L4 até a fase

adulta (24 h). A quantificação de ambas as marcações ocorreu nos primeiros pares de células intestinais. Os resultados foram expressos em porcentagem do controle (média de fluorescência, DP, n= 10-25); **p<0.001; ***p<0.0001, estatisticamente diferente comparado ao controle (DMSO) por ANOVA de uma via seguido por teste *post hoc* de Bonferroni.

Para avaliar a cinética da redução lipídica induzida pela ziprasidona, verificamos os estoques lipídicos, evidenciados pelo marcador *Nile Red*, em diferentes tempos. Constatamos que a ziprasidona reduz significativamente a fluorescência do marcador lipídico *Nile Red* após 8 h (Figura 7).

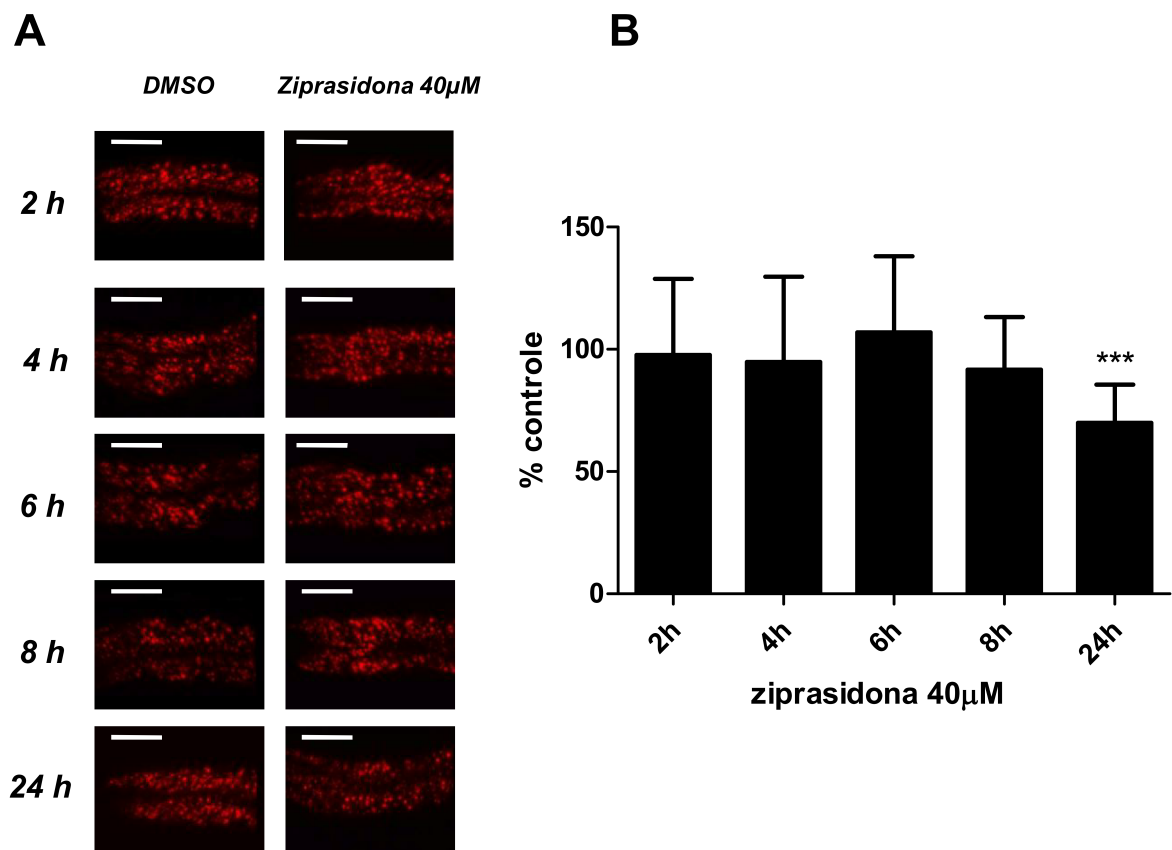


Figura 7: Curva tempo-resposta frente ao tratamento com ziprasidona em *C. elegans* selvagem (N2). (A) Fluorescência do *Nile Red* em vermes selvagens (N2) após tratamento com ziprasidona (40 μM) (B) Curva de concentração tempo-resposta por 2 h, 4 h, 6 h, 8 h e 24 h. As imagens foram adquiridas em plano único. A média da quantificação da fluorescência de *Nile Red* corresponde aos primeiros pares de células intestinais e foi expressa em porcentagem do controle (DMSO 0.16% em ácido acético (1:10 000)) no respectivo tempo (média de fluorescência, desvio padrão (DP), n= 20-

30); *** $p < 0.0001$, estatisticamente diferente comparado ao controle 24h por ANOVA de uma via seguido por teste *post hoc* de Bonferroni.

4.2 Efeitos da ziprasidona sobre o comportamento, desenvolvimento e morfologia do *C. elegans*

A redução no acúmulo lipídico pode ser decorrente de uma menor ingesta alimentar ou um maior gasto energético. Investigamos se a ziprasidona na mesma concentração na qual se observou a redução das reservas lipídicas (40 μM) altera, de alguma maneira, comportamentos metabolicamente custosos para o verme. Não foram observadas modificações no batimento faríngeo (Figura 8A), comportamento que denota o perfil alimentar do nematódeo, bem como alterações no trânsito intestinal, verificado através do intervalo entre os ciclos de defecação (Figura 8B).

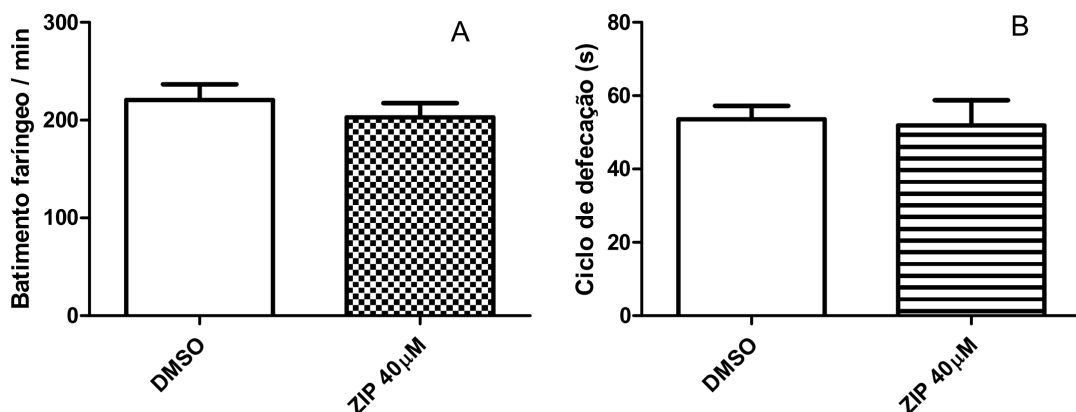


Figura 8: **Avaliação dos comportamentos de batimento faríngeo e ciclos de defecação em vermes selvagens expostos à ziprasidona por 24h.** Os vermes foram observados quanto ao batimento da faringe por minuto (A) e intervalo entre os ciclos de defecação (B). O tratamento com ziprasidona (40 μM) ou veículo (DMSO 0.16% em ácido acético (1:10 000)) iniciou-se no estágio larval L4 e transcorreu por 24 h até a fase adulta quando os comportamentos foram determinados. Não foram observadas diferenças significativas entre os vermes tratados e controles (médias, DP, $n=20$). Os experimentos foram realizados duas vezes em dias distintos.

O movimento do verme também foi analisado após tratamento com ziprasidona (40 μM) por 24 h. Consideramos três parâmetros representativos do

movimento: distância percorrida (Figura 9A), velocidade média (Figura 9B) e aceleração média (Figura 9C). Não encontramos alterações significativas nestes parâmetros após exposição a ziprasidona.

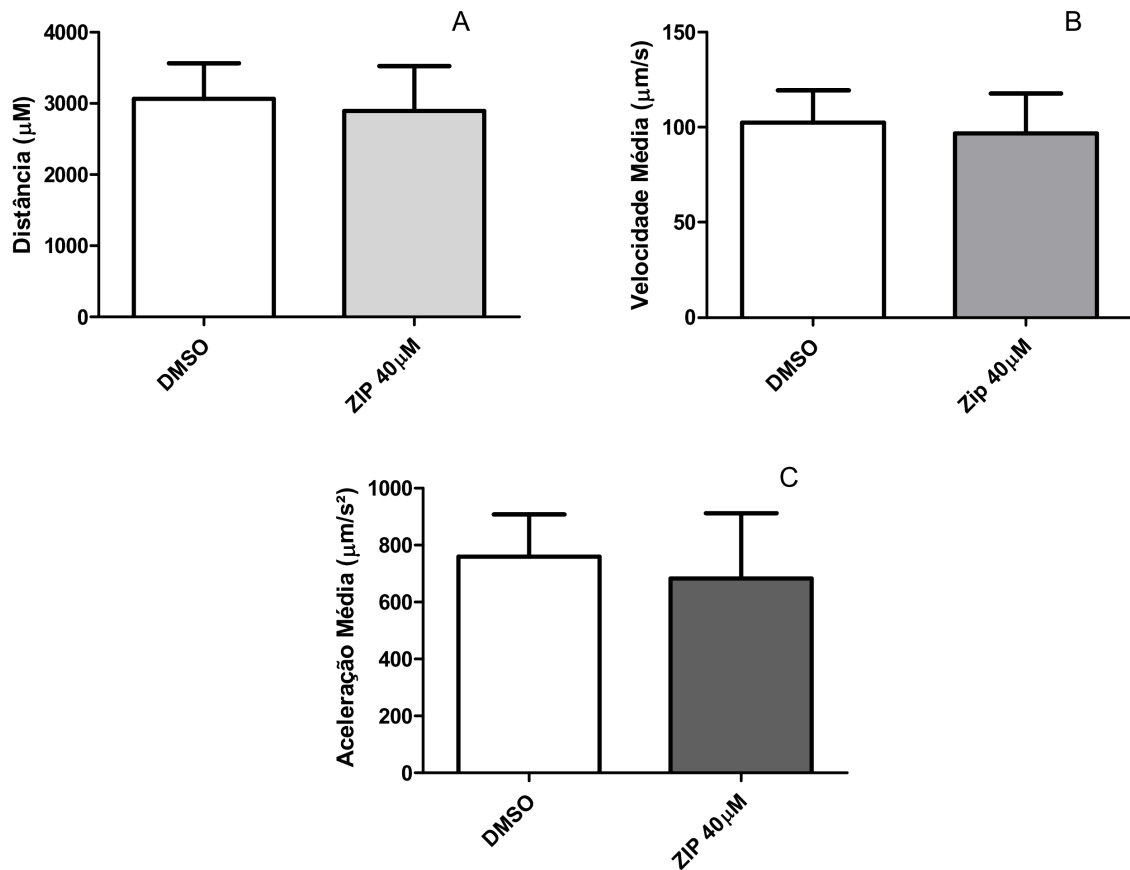


Figura 9: **Parâmetros representativos do movimento dos nematódeos *C. elegans* selvagens após exposição à ziprasidona.** (A) A distância percorrida, (B) velocidade média e (C) aceleração média foram observadas por 30 s após 24h de tratamento com ziprasidona (40 µM) ou controle (DMSO 0.16% em ácido acético (1:10 000)). Não foram observadas diferenças significativas entre os vermes tratados e controles (médias, DP, n=20). Os experimentos foram realizados três vezes em dias distintos.

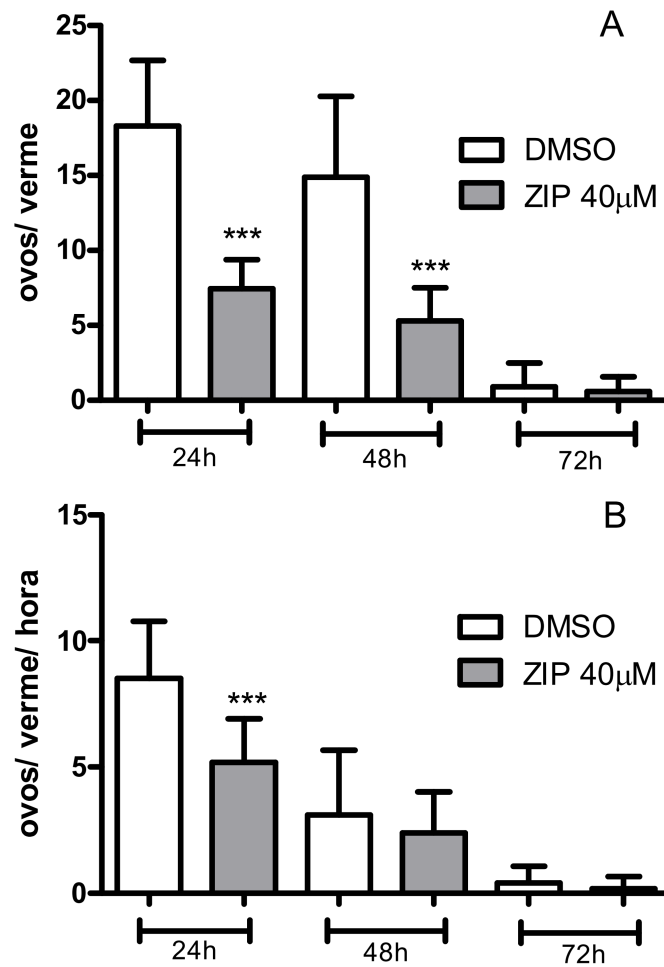


Figura 10: **Comportamento reprodutivo do nematódeo *C. elegans* após exposição à ziprasidona.** (A) A produção de ovos e (B) ovoposição foram observadas após 24, 48 e 72 horas de tratamento com ziprasidona (40 µM) ou veículo controle (DMSO 0.16% em ácido acético (1:10 000)). Os resultados representam a média de ovos no interior dos vermes (A) e a taxa de ovoposição (B) em média do número de ovos liberados por hora durante os diferentes tempos de tratamento. *** $p < 0.0001$, estatisticamente diferente comparado ao controle por ANOVA de uma via seguido por teste *post hoc* de Bonferroni (média, DP, $n > 20$).

Uma grande proporção da energia de um verme adulto é destinada à produção de ovos através da transferência do vitelo. Para verificar se a alteração lipídica induzida pela ziprasidona ocorre indiretamente através de alterações na reprodução, verificamos se a produção ou a ovoposição são moduladas pelo fármaco. O tratamento com ziprasidona (40 µM) reduziu drasticamente a presença de ovos no interior do verme (Figura 10A, $p < 0.001$), efeito este persistente até 48 h

de tratamento. Já a taxa de postura de ovos foi significativamente menor nas primeiras 24 h de tratamento (Figura 10B, $p < 0.001$).

Além disso, constatamos uma diminuição significativa no tamanho dos vermes tratados quando comparados aos nematódeos controles (Figura 11).

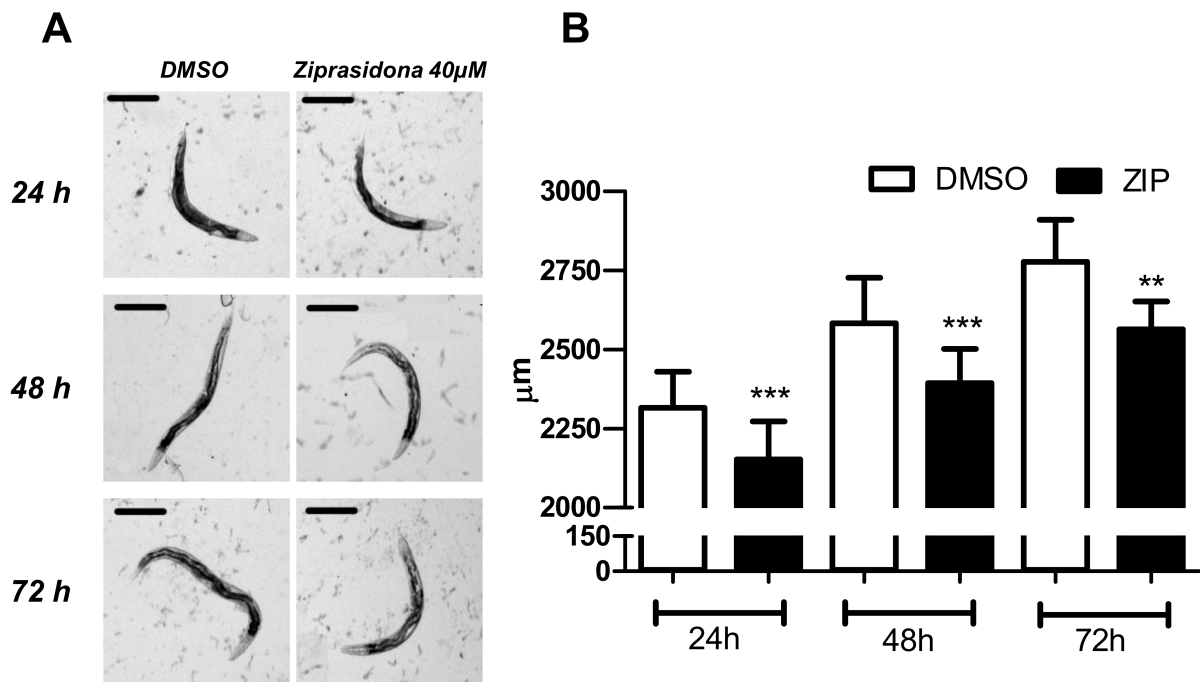


Figura 11: **Perímetro do verme selvagem (N2) após tratamento com ziprasidona por 24, 48 e 72 h.** (A) Imagens representativas dos vermes e (B) gráfico da quantificação do perímetro em μm após 24, 48 e 72 horas de exposição à ziprasidona ($40 \mu\text{M}$) ou veículo controle (DMSO 0.16% em ácido acético (1:10 000)). Após os tempos determinados, os animais foram retirados das placas de tratamento e as imagens foram feitas em estereoscópio em aumento de 40x (Nikon SMZ 1500 Stereoscope microscope). ** $p=0.003$; *** $p<0.0001$, estatisticamente diferentes comparados ao controle do respectivo tempo por Test-t de Student, (médias, DP, $n>20$). Os resultados foram confirmados duas vezes em dias distintos.

Como previamente descrito no estudo de Donohoe e colaboradores, alguns antipsicóticos alteram o desenvolvimento do verme (Donohoe *et al.*, 2006). No entanto, não observamos alterações no desenvolvimento quando os vermes N2 foram tratados a partir do estágio L1 com a mesma concentração de ziprasidona utilizada para as outras avaliações ($40 \mu\text{M}$) (Figura 12).

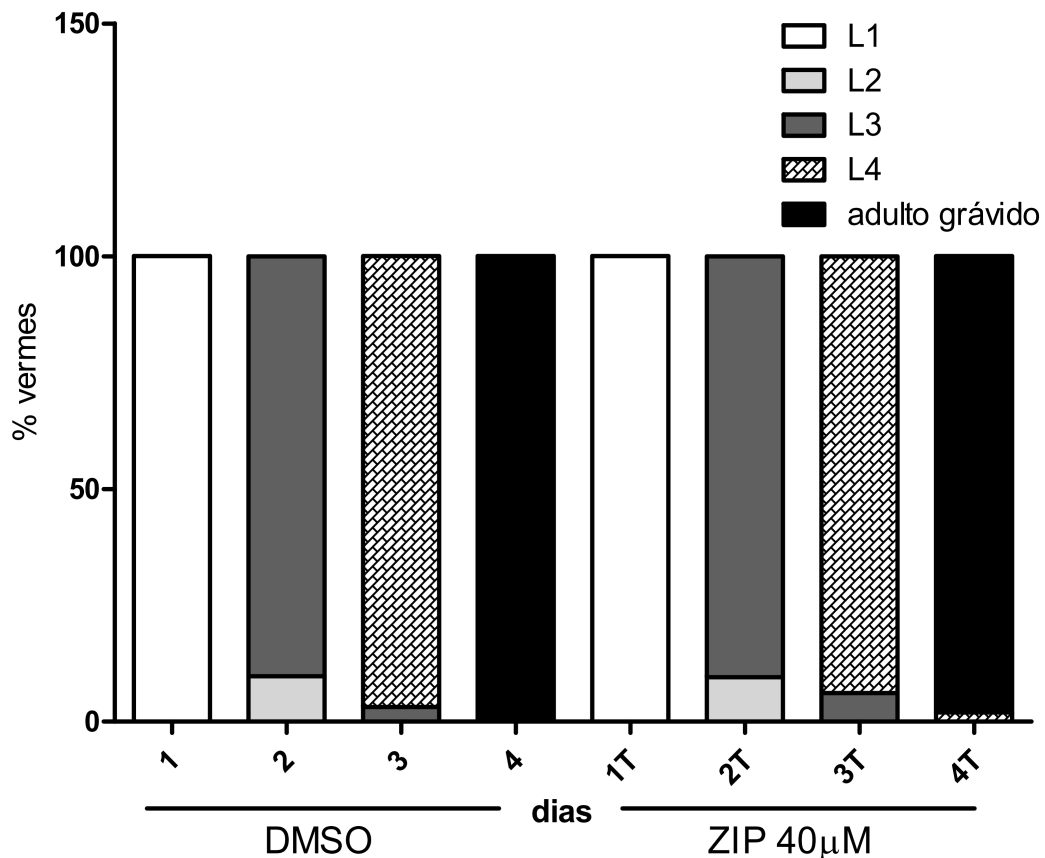


Figura 12: **Desenvolvimento larval do nematódeo *C. elegans* exposto à ziprasidona.** Os vermes foram tratados com ziprasidona (40 µM) ou controle (DMSO 0.16% em ácido acético (1:10 000)) a partir do estágio larval L1 até adulto grávido. Os resultados foram avaliados por ANOVA de duas vias e não houve diferenças significativas entre os grupos (% verme no determinado estágio larval, n=20).

4.3 Mecanismos de ação da ziprasidona sobre o metabolismo de lipídios

A próxima etapa foi investigar as vias envolvidas no efeito da ziprasidona sobre as reservas lipídicas. Estudos mostram que a sinalização serotoninérgica está relacionada ao controle dos depósitos de gordura no *C. elegans* (Ashrafi *et al.*, 2003), além de ser um alvo farmacológico da ziprasidona (Stahl & Shayegan, 2003). Para verificar uma possível relação entre o sistema serotoninérgico e o fenótipo induzido pela ziprasidona, utilizamos vermes carreando mutações com perda de função para os genes dos receptores de serotonina *ser-4*, *ser-1*, *ser-6*, *ser-7*, *ser-3* e *mod-1*; bem como, para o transportador de serotonina (*mod-5*) e para a enzima catalisadora da síntese desse neurotransmissor (triptofano hidroxilase, *tph-1*) e avaliamos o fenótipo lipídico induzido pela ziprasidona através do marcador *Nile*

Red. Todos os mutantes estudados responderam ao tratamento com 40 μ M de forma semelhante ao verme selvagem (Figura 13A e 13C). O mutante *ser-3* apresentou maior redução das reservas lipídicas quando comparada a redução nos controles selvagem ($p < 0.001$). Os mutantes *mod-1* e *ser-6* apresentaram um perfil naturalmente aumentado na fluorescência do *Nile Red* quando comparados a cepa selvagem (Figura 13B). No entanto, não observamos diferença na proporção de perda lipídica.

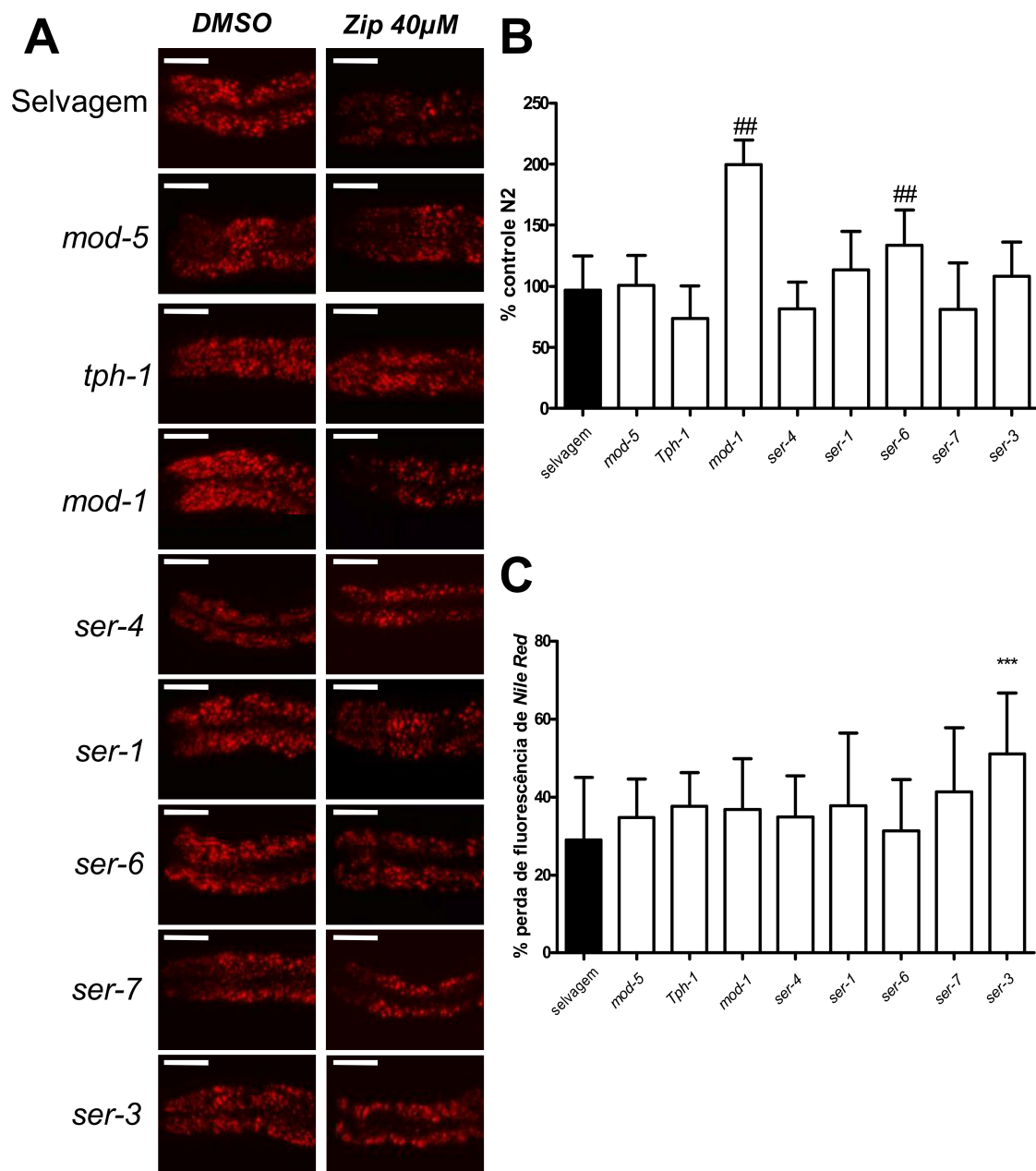


Figura 13: Efeito da ziprasidona sobre a fluorescência do marcador *Nile Red* em vermes mutantes para componentes do sistema serotoninérgico. (A) Imagens representativas da fluorescência do *Nile Red* nos vermes mutantes e selvagem; (B) Perfil de fluorescência do marcador

Nile Red nos mutantes expostos ao veículo (DMSO 0.16% em ácido acético (1:10 000)) e (C) porcentagem de perda de fluorescência nos mutantes expostos à ziprasidona (40 μ M) comparados ao verme selvagem (N2). O tratamento iniciou no estágio larval L4 e transcorreu por 24 h até a fase adulta. ## $p < 0.0001$ estatisticamente diferente comparado ao nematódeo selvagem exposto ao veículo; *** $p < 0.0001$ estatisticamente diferente comparado ao verme selvagem exposto à ziprasidona (40 μ M) (% controle, DP, $n > 15$). Ambas as significâncias constatadas por ANOVA de uma via seguida por teste *post hoc* de Bonferroni.

O controle de inúmeras funções no *C. elegans* ocorre através da atuação das monoaminas (Sulston *et al.*, 1975; Sanyal *et al.*, 2004; Horvitz *et al.*, 1982). Expusemos os vermes exogenamente às monoaminas TA, OA, DA e 5-HT (5 mM) separadamente ou em associação à ziprasidona a fim de superativar estes sistemas e verificar sua influência sobre o acúmulo de fluorescência por *Nile Red* (Figura 14). Observamos uma redução na quantificação de fluorescência frente ao tratamento com 5-HT (~ 60%, Fig. 14D) e DA (~ 40%, Fig. 14B) comparado ao controle. Além disso, a exposição conjunta de 5-HT e ziprasidona resultou em um efeito aditivo sobre a redução da fluorescência. As monoaminas TA (Fig. 14A) e OA (Fig. 14C) não resultaram em alteração significativa nas concentrações testadas (5 mM). Todavia quando associada à ziprasidona, a TA impediu redução na fluorescência do marcador *Nile Red* por este antipsicótico (Fig. 14A).

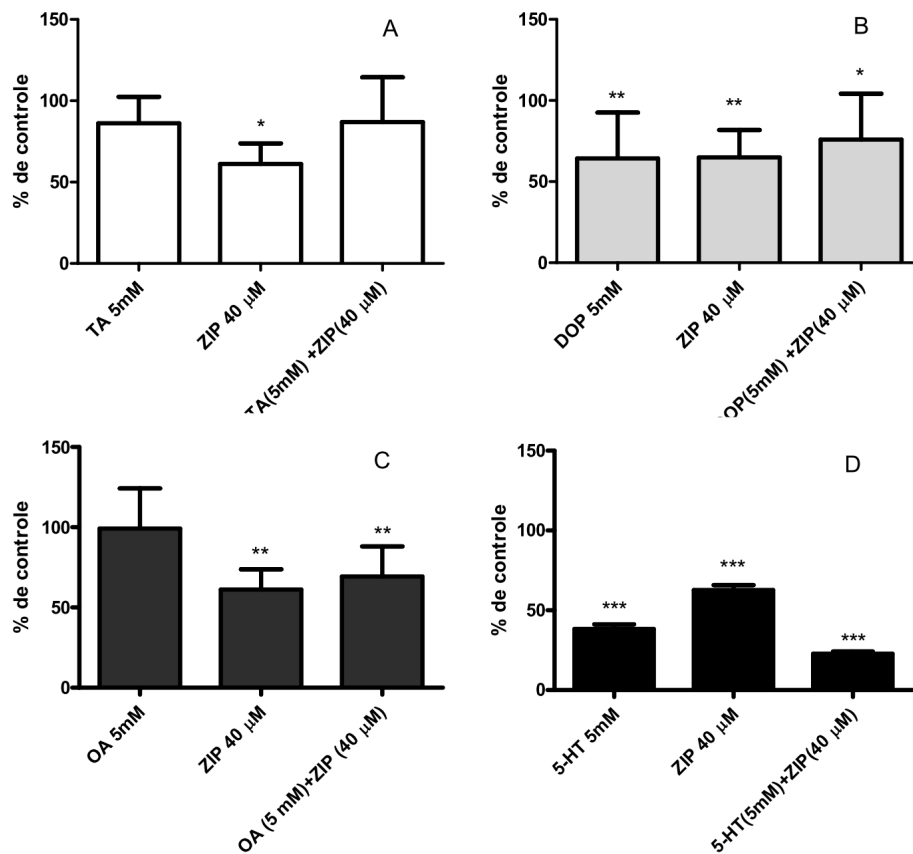
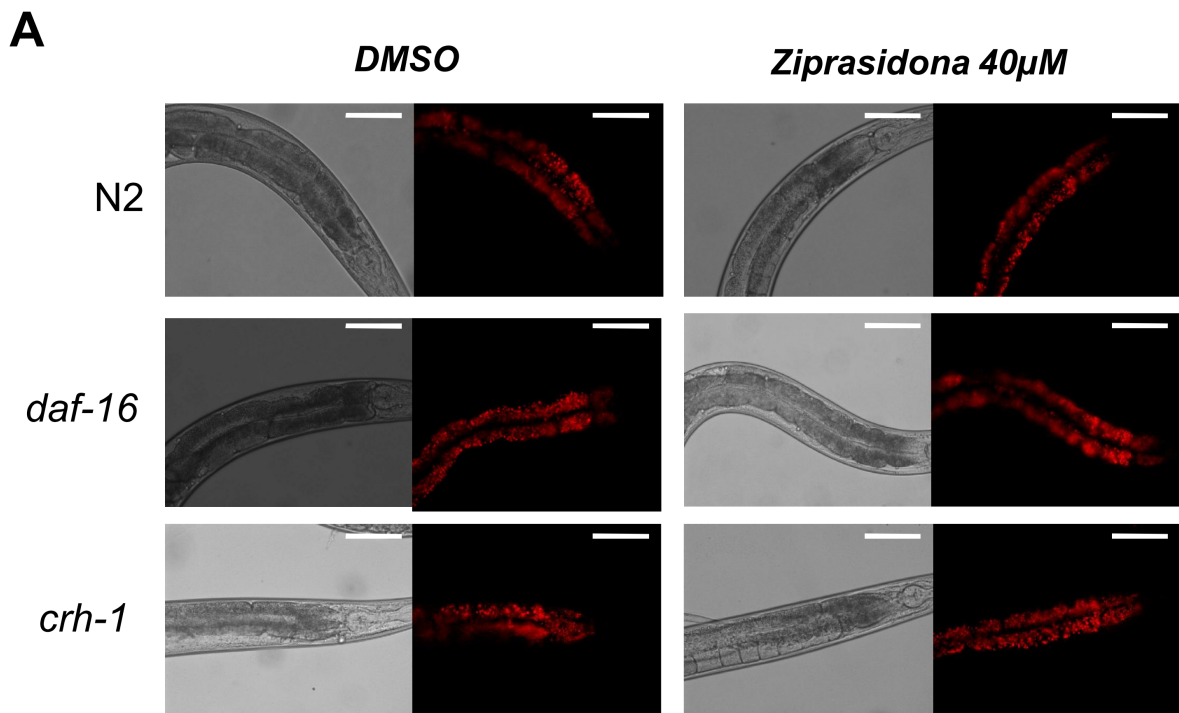


Figura 14: **Efeito nos estoques lipídicos da exposição exógena às monoaminas e à ziprasidona em vermes selvagem.** Os nematódeos foram expostos às monoaminas (A) tiramina (TA, 5 mM), (B) dopamina (DA, 5 mM), (C) octopamina (AO, 5 mM) e (D) serotonina (5-HT, 5 mM) isoladas ou conjuntamente à ziprasidona (40 μM). Os resultados foram expressos em % do respectivo controle: HCl 0.1N (comparado as monoaminas), DMSO (0.16% em ácido acético (1:10 000), comparado ao grupo ziprasidona) e HCl + DMSO (comparado à associação monoamina+ziprasidona). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, estatisticamente diferente comparado ao respectivo controle por ANOVA de uma via seguido por teste *post hoc* de Bonferroni (% controle, DP, $n = 20$).

Testamos também mutação com perda de função em dois fatores de transcrição importantes no controle do metabolismo no verme. Tanto no mutante para *daf-16* quanto para *crh-1*, observamos reversão nos efeitos da ziprasidona sobre a diminuição da fluorescência por *Nile Red* (Figura 15).



B

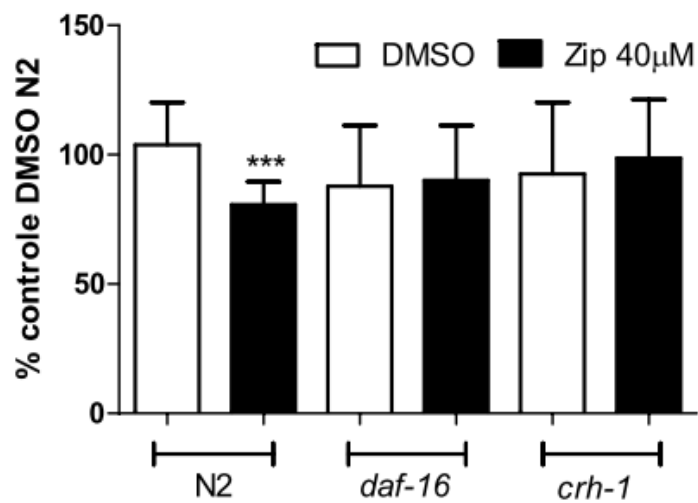


Figura 15: Recuperação do perfil lipídico mensurado através do marcador *Nile Red* em mutantes para os fatores de transcrição *daf-16* e *crh-1* após tratamento com ziprasidona (40 μ M). (A) Imagens representativas da fluorescência do *Nile Red* e (B) quantificação da fluorescência em *C. elegans* mutantes (*daf-16*, *crh-1*) e selvagem (N2). Os resultados foram expressos em % de controle DMSO (média de fluorescência, DP, n > 25); ***p < 0.0001, estatisticamente diferente comparado ao controle por ANOVA de uma via seguido por teste *post hoc* de Bonferroni.

5 Discussão

A ziprasidona é um antipsicótico atípico que se distingue pela baixa incidência de ganho de peso em relação a outros antipsicóticos atípicos (Rummel-Kluge *et. al.*, 2010). No entanto, não está claro o mecanismo molecular responsável por tal fato. Para avaliar possíveis vias moleculares relacionadas, utilizamos o nematódeo *C. elegans*. Nosso estudo constatou uma redução no acúmulo lipídico após exposição ao fármaco. Tal fato parece ser independente de outros comportamentos testados e de alterações morfológicas no verme. A caracterização dos estoques lipídicos foi realizada através da utilização de três marcados fluorescentes (*Nile Red*, BODIPY e *LipidTox*), todos, com mostrando a mesma tendência (Figuras 5 e 6). A diferença entre a magnitude da redução mensurada pelos diferentes marcadores pode ser justificada pelas diferenças físico-químicas dos mesmos além da capacidade de evidenciar grupos diversos de lípidos. O *Nile Red* é um fluoróforo inespecífico que marca lipídios neutros (TGA e colesterol esterificado) e polares (fosfolipídios). Por sua vez, o BODIPY marca a maioria dos estoques de lipídios sem alterar a morfologia do verme e o *LipidTox Green* marca especificamente TGA. Além disso, outras variáveis podem ser inclusas como os diferentes equipamentos utilizados para a aquisição das imagens (microscópio de fluorescência/APOTOME e Confocal) e a maneira como as mesmas foram adquiridas (série Z ou plano único). A forma de quantificação, fluorescência total na área referente aos primeiros pares de células intestinais, não considera as gotículas lipídicas individualmente o que pode contribuir para a diferença encontrada entre os marcadores. Ainda ressaltamos que os efeitos exercidos pela ziprasidona sobre o acúmulo de fluorescência ocorreram em baixas concentrações (10 μ M, $p < 0.05$).

O equilíbrio das reservas lipídicas ocorre primariamente pela diferença entre quantidade de energia ingerida e gasta pelo organismo. Buscamos saber se a redução na fluorescência dos marcadores lipídicos causada pela ziprasidona, que indiretamente indica o estoque de gorduras neutras no verme, seria consequência indireta da modulação de comportamentos energeticamente dispendiosos pelo fármaco. Não verificamos alterações na taxa de alimentação, trânsito intestinal ou movimentação do nematódeo após o tratamento com ziprasidona (40 μ M) por 24 h (Figura 8 e 9). Tais comportamentos já foram caracterizados após exposição a

outros antipsicóticos sabidamente indutores de ganho de peso como clozapina e olanzapina. Revelou-se que, em altas concentrações, estes antipsicóticos são capazes de reduzir o batimento faríngeo do verme (Karmacharya *et al.*, 2009). Ainda, sabe-se que a reprodução demanda alta quantidade de energia; os lipídios são transportados das células intestinais e hipoderme para a gônada no intuito de fornecer combustível para a nutrição germinal. Verificamos que a ziprasidona reduziu a produção de ovos e ovoposição. Somados, os fenótipos indicam uma “lentificação” do comportamento reprodutivo o que reduziria a demanda energética, em teoria. Tal fato corrobora a interpretação que o fármaco atua em via neuroendócrina distinta para o controle lipídico considerando que caso fosse um fenótipo indireto a tendência esperada seria o aumento dos estoques de energia. Por outro lado, talvez a redução das reservas lipídicas pela ziprasidona pode impactar negativamente no comportamento reprodutivo, sendo este consequência da caquexia no verme determinada pelo fármaco. Contrariamente, em ratos, a ziprasidona não gerou quaisquer alterações no perfil reprodutivo (Fell *et al.*, 2005). Outra característica interessante é a redução no tamanho dos vermes expostos ao fármaco. Este efeito já foi descrito após exposição do verme a outros antipsicóticos (Donohoe *et al.*, 2006), entretanto os mecanismos moleculares responsáveis permanecem desconhecidos. Considerando que as doenças neuropsiquiátricas estão relacionadas a alterações no neurodesenvolvimento (Beneyto & Lewis, 2011), futuros estudos sobre as vias moleculares responsáveis por este fenótipo induzido pelos antipsicóticos podem trazer novas ideias sobre a patogênese destas doenças.

Diferentes estágios larvais demandam diferentes balanços energéticos. Consequentemente, uma explicação trivial para a diminuição nas reservas lipídicas é que mantendo o verme em outro estágio do ciclo de vida, a ziprasidona poderia causar alterações lipídicas indiretamente. Esclarecemos esta relação com alguns experimentos. Apesar do tamanho dos vermes expostos a ziprasidona ser significativamente menor após tratamento crônico a partir do estágio L4 (Figura 11), as características morfológicas específicas de cada estágio larval (como desenvolvimento vulvar, gonadal e produção de ovos (<http://www.wormatlas.org>) foram similares após exposição iniciada em estágio larval L1. Dessa forma, a exposição à ziprasidona não altera a progressão do verme no ciclo de vida e sim o tamanho. Sabe-se que a progressão do desenvolvimento demanda energia para mitose, manutenção e crescimento celular (Elle *et al.*, 2008). Assim a redução no

tamanho dos vermes pode ser justificada pela menor disponibilidade energética induzida pela exposição à ziprasidona. Alternativamente, o número reduzido de ovos na cavidade uterina dos vermes expostos a ziprasidona também pode justificar medições menores. Pela impossibilidade de criar fator de correção através da mensuração do perímetro uterino com as técnicas disponíveis até o momento, não podemos descartar este fato. Não verificamos sinais de toxicidade induzida pelo fármaco.

O próximo passo deste estudo foi verificar as possíveis vias moleculares pelas quais este antipsicótico está alterando as reservas lipídicas no nematódeo. A ziprasidona age, como já foi reportado, principalmente sobre dois sistemas de neurotransmissores encontrados no *C. elegans*: o sistema dopaminérgico e serotoninérgico (Sprouse *et al.*, 1999). Partindo do princípio que a atuação sobre a via serotoninérgica é a primordial diferença entre as duas classes de antipsicóticos e confere atipicidade à segunda classe destes fármacos, testamos os vermes com mutações para componentes desta via como receptores (*ser-4*, *ser-1*, *ser-6*, *ser-7*, *ser-3* e *mod-1*), transportador (*mod-5*) e a enzima sintetizadora de 5-HT (*tph-1*). Entretanto, em nenhuma das situações verificamos a reversão do perfil induzido pela ziprasidona no acúmulo lipídico (Figura 13). Apesar da ortologia genética com mamíferos, não é possível afirmar que a farmacodinâmica da ziprasidona seja a mesma no nematódeo. Além disso, as mutações para os genes foram testadas isoladamente e pode haver uma ação conjunta de vários receptores para que ocorra o efeito sobre o acúmulo lipídico. Já foi demonstrado que as monoaminas agem como moduladoras de eventos comportamentais e equilíbrio energético no *C. elegans*. Após a exposição exógena a estas monoaminas, verificamos alguns resultados congruentes aos reportados em outros trabalhos como a redução no acúmulo lipídico frente ao tratamento com 5-HT (Srinivasan *et al.*, 2008) e DA (dados de nosso grupo não publicados). Efeito este, não observado com as outras duas monoaminas OA e TA. Na presença das monoaminas (5-HT, DA e OA), a exposição à ziprasidona continuou gerando o fenótipo de redução dos estoques lipídicos o que foi potencializado pela 5-HT (Figura 14). Possivelmente este isto nos faz pensar que o fenótipo observado frente à exposição à ziprasidona esteja ocorrendo pela atuação deste neuroléptico em vias alternativas às serotoninérgicas. Já o tratamento com ziprasidona em vermes expostos a TA impediu o aparecimento do fenótipo. Isto indica que o sistema tiraminérgico é necessário para o fenótipo

lipídico da ziprasidona. A TA está presente em pequenas quantidades no nematódeo *C. elegans*, isto talvez porque grande parte desta monoamina seja utilizada na síntese de OA (Alkema *et al.*, 2005). Dados do nosso grupo, ainda não publicados, sugerem que a octopamina induz aumento nas reservas lipídicas do verme. Ainda não é possível elaborar nenhuma conclusão a respeito do envolvimento da TA nos efeitos da ziprasidona, pois estudos mais aprofundados precisam ser realizados. Porém, não descartamos a hipótese de que a TA possa estar agindo indiretamente através da produção de OA e assim regulando o acúmulo de lipídios.

Em geral, as vias de sinalização ativadas pelas monoaminas resultam na modulação de fatores de transcrição (Liang *et al.*, 2006). Considerando que estes são responsáveis pelo controle metabólico do verme, avaliamos a associação de alguns fatores com o fenótipo induzido pela ziprasidona. Os mutantes dos fatores DAF-16 (*daf-16*) e CREB (*crh-1*) não reduziram os estoques lipídicos após o tratamento com o antipsicótico (Figura 15). Já foi reportado que a ausência de alimento, bem como a exposição exógena à OA causam a ativação de CREB no verme e este fator por sua vez ativa a transcrição de inúmeros outros genes. Embora ainda não se saiba o exato papel fisiológico da ativação do CREB no *C. elegans* (Suo *et al.*, 2006, 2009). Da mesma forma, o fator de transcrição DAF-16 tem sido relacionado ao controle do metabolismo neste nematódeo (Lee *et al.*, 2003). Estudos tem mostrado que a lipase K04A8.5 parece ser regulada por DAF-16 nas células intestinas do *C. elegans* (Wang *et al.*, 2008). Entretanto, estas vias ainda necessitam de maiores observações para que possam ser relacionadas aos efeitos da ziprasidona. A reversão semelhante em ambos fatores de transcrição sugere que os mesmos agem de forma epistática na regulação da homeostase das reservas lipídicas frente o tratamento com ziprasidona.

6 Conclusão e Perspectivas

O presente trabalho mostrou os efeitos do antipsicótico atípico ziprasidona sobre as reservas lipídicas e comportamentos do verme *C. elegans*. Além disso, a exposição à ziprasidona induziu redução no tamanho dos nematódeos sem alterar a progressão da maturidade larval. Verificamos ainda, que a via serotoninérgica parece não estar envolvida nos efeitos da ziprasidona. No entanto, encontramos

reversão dos efeitos da mesma durante a associação deste antipsicótico à monoamina tiramina e na ausência dos fatores de transcrição DAF-16 e CREB, o que sugere que ambas as condições podem envolver fatores e/ou sistemas importantes para o efeito do antipsicótico nos estoques lipídicos do verme. Estas vias precisam ainda ser mais estudadas, isto porque outros fatores de transcrição podem estar também envolvidos e faz-se necessário esclarecer a relação entre eles. Aliado a isso, examinar as vias responsáveis pela ocorrência dos outros efeitos causados pela ziprasidona como, por exemplo, sobre o comportamento reprodutivo do nematódeo *C. elegans*.

7 Referências

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

Alkema MJ, Hunter-Ensor M, Ringstad N, Horvitz HR. Tyramine Functions Independently of Octopamine in the *Caenorhabditis elegans* Nervous System. **Neuron**. 2005; 46(2): 247-260.

Antoshechkin I, Sternberg PW. The versatile worm: Genetic and genomic resources for *Caenorhabditis elegans* research. **Nat. Rev. Genet.** 2007; 8: 518-532.

Apfeld J, O'Connor G, McDonagh T, DiStefano SP, Curti R. The AMP-activated protein kinase AAK-2 links energy levels and insulin-like signals to lifespan in *C. elegans*. **Genes Dev.** 2004; 18(24): 3004-3009.

Ashrafi K, Chang FY, Watts JL, Fraser AG, Kamath RS, Ahringer J, Ruvkun G. Genome-wide RNAi analysis of *Caenorhabditis elegans* fat regulatory genes. **Nature**. 2003; 421(6920): 268-272.

Ashrafi K. *WormBook, The C. elegans Research Community*. 2007. Obesity and the regulation of fat metabolism. ed. doi/10.1895/wormbook.1.130.

Baptista T, Kin NMKNY, Beaulieu S, de Baptista EA. Obesity and related metabolic abnormalities during antipsychotic drug administration: mechanisms, management and research perspectives. **Pharmacopsychiatry**. 2002; 35 (6): 205-219.

Batool F, Shah AH, Ahmed SD, Saify ZS, Haleem DJ. Protective effects of aqueous fruit extract from Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L. ssp. *turkestanica*) on haloperidol-induced orofacial dyskinesia and neuronal alterations in the striatum. **Med Sci Monit**. 2010; 16(8): BR285-292.

Beneyto M, Lewis DA. Insights into the neurodevelopmental origin of schizophrenia from postmortem studies of prefrontal cortical circuitry. **Int. J. Devl Neuroscience**. 2011; 29: 295-304.

Branicky R, Desjardins D, Liu JL, Hekimi S. Lipid Transport and Signaling in *Caenorhabditis elegans*. **Dev Dyn**. 2010; 239(5): 1365-1377.

Brenner S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**. 1974; 77: 71-74.

Bressan RA, Erlandsson K, Jones HM, Mulligan R, Flanagan RJ, Ell PJ, Pilowsky LS. Is regionally selective D2/D3 dopamine occupancy sufficient for atypical antipsychotic effect? an in vivo quantitative [123I]epidepride SPET study of amisulpride-treated patients. **Am J Psychiatry**. 2003; 160(8): 1413-1420.

Brownlee DJA, Fairweather I. Exploring the neurotransmitter labyrinth in nematodes. **Trends in Neurosciences**. 1998; 22 (1): 16-24.

Carlsson A, Waters N, Holm-Waters S, Tedroff J, Nilsson M, and Carlsson ML. Interactions between monoamines, glutamate, and GABA in schizophrenia: new evidence. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**. 2001; 41: 237-260.

Carlsson ML, Carlsson A, Nilsson M. Schizophrenia: from dopamine to glutamate and back. **Curr Med Chem**. 2004; 11: 267-77.

Carre-Pierrat M, Baillie D, Johnsen R, Hyde R, Hart A, Granger L, Ségalat L. Characterization of the *Caenorhabditis elegans* G protein-coupled serotonin receptors. **Invert Neurosci**. 2006; 6(4): 189-205.

Casey DE, Zorn SH. The pharmacology of weight gain with antipsychotics. **J Clin Psychiatry**. 2001; 62: 4-10.

Corsi AK. A biochemist's guide to *Caenorhabditis elegans*. **Anal Biochem**. 2006; 359 (1): 1-17.

de Bartolomeis A, Fiore G, Iasevoli F. Dopamine–glutamate interaction and antipsychotics mechanism of action: implication for new pharmacological strategies in psychosis. **Curr Pharm Des**. 2005; 11: 3561-3594.

Dernovici S, Starc T, Dent JA, Ribeiro P. The serotonin receptor SER-1 (5HT2ce) contributes to the regulation of locomotion in *Caenorhabditis elegans*. **Dev neurobiol**. 2007; 67(2): 189-204.

Donald DL. (Ed.). **C. elegans II**. New York, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1997.

Donohoe DR., Aamodt EJ, Osborn E, Dwyer DS. Antipsychotic drugs disrupt normal development in *Caenorhabditis elegans* via additional mechanisms besides dopamine and serotonin receptors. **Pharmacol. Res.** 2006; 5:361–372.

Donohoe DR, Jarvis RA, Weeks K, Aamodt EJ, Dwyer DS. Behavioral adaptation in *C. elegans* produced by antipsychotic drugs requires serotonin and is associated with calcium signaling and calcineurin inhibition. **Neurosci. Res.** 2009; 64(3), 280-289.

Dorman JB, Albinder B, Shroyer T, Kenyon C. The age-1 and daf-2 genes function in a common pathway to control the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. **Genetics.** 1995; 141(4): 1399-1406.

Elle IC, Olsen LCB, Mosbech MB, Rødkær SV, Pultz D, SG, Fredens J, Sørensen P, Færgeman NJ. *C. elegans*: A Model for Understanding Lipid Accumulation. **Lipid Insights.** 2008; 1: 1-21.

Fell MJ, Gibson R, McDermott E, Sisodia G, Marshall KM, Neill JC. Investigation into the effects of the novel antipsychotic ziprasidone on weight gain and reproductive function in female rats. **Behav Brain Res.** 2005; 160(2): 338-343.

Gami MS, Iser WB, Hanselman KB, Wolkow CA. Activated AKT/PKB signaling in *C. elegans* uncouples temporally distinct outputs of DAF-2/insulin-like signaling. **BMC Dev Biol.** 2006; 6(45): 1-14.

Hamann A, Brieske C, Tafel J, Buttron P, Schwarzloh B, Münzberg H, Hinney A, Mayer H, Siegfried W, Hebebrand J, Greten H, Algenstaedt P, Ziegler R. Identification of a deletion variant in the gene encoding the human alpha(2A)-adrenergic receptor. **Eur J Endocrinol.** 2001; 144(3): 291-295.

Hamelin BA, Allard S, Laplante L, Miceli J, Wilner KD, Tremblay J, LeBel M. The effect of timing of a standard meal on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of the novel atypical antipsychotic agent ziprasidone. **Pharmacotherapy.** 1998; 18(1): 9-15.

Heinonen P, Koulu M, Pesonen U, Karvonen MK, Rissanen A, Laakso M, Valve R, Uusitupa M, Scheinin M. Identification of a three-amino acid deletion in the alpha2B-adrenergic receptor that is associated with reduced basal metabolic rate in obese subjects. **J Clin Endocrinol Metab.** 1999; 84(7): 2429-2433.

Hills T, Brockie PJ, Maricq AV. Dopamine and glutamate control area-restricted search behavior in *Caenorhabditis elegans*. **J Neurosci**. 2004; 24(5): 1217-25.

Hobson RJ, Geng J, Gray AD, Komuniecki RW. SER-7b, a constitutively active Galphas coupled 5-HT7-like receptor expressed in the *Caenorhabditis elegans* M4 pharyngeal motoneuron. **J Neurochem**. 2003; 87(1): 22-29.

Hope IA. (Ed.) **C. elegans. A-practical-approach**. Oxford University Press, Oxford. 1999.

Horvitz HR, Chalfie M, Trent C, Evans PD. Serotonin and octopamine in the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Science**. 1982; 216(4549): 1012-1014.

<http://www.wormatlas.org>. Acessado em 11 de dezembro de 2011.

Jia S, Noma K, Grewal SI. RNAi-independent heterochromatin nucleation by the stress-activated ATF/CREB family proteins. **Science**. 2004; 304: 1971-1976.

Jo H, Shim J, Lee JH, Lee J, Kim JB. IRE-1 and HSP-4 contribute to energy homeostasis via fasting-induced lipases in *C. elegans*. **Cell Metab**. 2009; 9(5): 440-448.

Kage-Nakadai E, Kobuna H, Kimura M, Gengyo-Ando K, Inoue T, Arai H, Mitani S. Two very long chain fatty acid acyl-CoA synthetase genes, *acs-20* and *acs-22*, have roles in the cuticle surface barrier in *Caenorhabditis elegans*. **PLoS One**. 2010; 5(1), e8857.

Kalinichev M, Rourke C, Jones DN. Body weights and plasma prolactin levels in female rats treated subchronically with ziprasidone versus olanzapine. **Behav Pharmacol**. 2006; 17(3): 289-292.

Kalinichev M, Rourke C, Daniels AJ, Grizzle MK, Britt CS, Ignar DM, Jones DN. Characterization of olanzapine-induced weight gain and effect of aripiprazole vs olanzapine on body weight and prolactin secretion in female rats. **Psychopharmacology**. 2005; 182(2): 220-231.

Karmacharya R, Sliwoski GR, Lundy MY, Suckow RF, Cohen BM, Buttner, EA. Clozapine interaction with phosphatidyl inositol 3-kinase (PI3K)/insulin signaling

pathway in *Caenorhabditis elegans*. **Neuropsychopharmacology**. 2009; 34:1968–1978.

Kapur S, Remington G. Atypical Antipsychotics: New Directions and New Challenges in the Treatment of Schizophrenia. **Annu Rev Med**. 2001; 52: 503-17.

Kapur S, Seeman P. Does fast dissociation from the dopamine D2 receptor explain the action of atypical antipsychotics? A new hypothesis. **Am J Psychiatry**. 2001; 158: 360-369.

Kimble J, Sharrock WJ. Tissue-specific synthesis of yolk proteins in *Caenorhabditis elegans*. **Dev. Biol**. 1983; 96(1): 189-196.

Kimura K, Tissenbaum HA, Liu Y, Ruvkun G. daf-2, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. **Science**. 1997; 277: 942-946.

Kurzchalia S, Ward TV. Why do worms need cholesterol? **Nature Cell Biol**. 2003; 5: 684-688.

Laruelle M, Kegeles LS, Abi-Dargham A. Glutamate, dopamine, and schizophrenia: from pathophysiology to treatment. **Ann NY Acad Sci**. 2003; 1003: 138-158.

Lee SS, Kennedy S, Tolonen AC, Ruvkun G. AF-16 Target Genes That Control *C. elegans* Life-Span and Metabolism. **Science**. 2003; 300(5619): 644-647.

Liang B, Moussaif M, Kuan CJ, Gargus JJ, Sze JY. Serotonin targets the DAF-16/FOXO signaling pathway to modulate stress responses. **Cell Metab**. 2006; 4(6): 429-440.

Lieberman JA, Stroup TS, McEvoy JP, Swartz MS, Rosenheck RA, Perkins DO, Keefe RS, Davis SM, Davis CE, Lebowitz BD, Severe J, Hsiao JK; Clinical Antipsychotic Trials of Intervention Effectiveness (CATIE) Investigators. Effectiveness of antipsychotic drugs on patients with chronic schizophrenia. **N Engl J Med**. 2005; 353(11):1209-1223.

Lin K, Hsin H, Libina N, Kenyon C. Regulation of the *Caenorhabditis elegans* longevity protein DAF-16 by insulin/IGF-1 and germline signaling. **Nat. Genet**. 2001; 28: 139-145.

Lin Y-T, Hoang H, Hsieh S, Rangel N, Foster AL, Sampayo JN, Lithgow GJ, Srinivasan. Manganous ion supplementation accelerates wild type development, enhances stress resistance, and rescues the life span of a short-lived *Caenorhabditis elegans* mutant. **Free Rad Biol Med**. 2006; 40(7): 1185-1193.

Long X, Spycher C, Han ZS, Rose AM, Muller F, Avruch J. TOR deficiency in *C. elegans* causes developmental arrest and intestinal atrophy by inhibition of mRNA translation. **Curr Biol**. 2002; 12: 1448-1461.

Mak HY, Nelson LS, Basson M, Johnson CD, Ruvkun G. Polygenic control of *Caenorhabditis elegans* fat storage. **Nat Genet**. 2006; 38(3): 363-368.

McIntyre RS, Mancini DA, Basile VS; Mechanisms of antipsychotic-induced weight gain. **J Clin Psychiatry**. 2001; 62: 23-29.

McIntyre RS, McCann SM, Kennedy SH. Antipsychotic metabolic effects: weight gain, diabetes mellitus, and lipid abnormalities. **Can J Psychiatry**. 2001; 46(3): 273-281.

McKay RM, McKay JP, Avery L, Graff JM. *C. elegans*: a model for exploring the genetics of fat storage. **Dev Cell**. 2003; 4(1): 131-42.

Meltzer HY, Li Z, Kaneda Y, Ichikawa J. Serotonin receptors: their key role in drugs to treat schizophrenia. **Prog Neuropsychoph Biol Psychiatry**. 2003; 27(7): 1159–1172.

Meltzer HY, Massey BW. The role of serotonin receptors in the action of atypical antipsychotic drugs. **Curr Opin Pharmacol**. 2011; 11(1): 59-67.

Meltzer HY. Treatment of suicidality in schizophrenia. **Annals of the New York Academy of Sciences**. 2001; 932:44-60

Minet-Ringuet J, Even PC, Lacroix M, Tomé D, de Beaurepaire R. A model for antipsychotic-induced obesity in the male rat. **Psychopharmacology (Berl)**. 2006; 187(4):447-54.

Miyamoto S, Duncan GE, Marx CE, Lieberman JA. Treatments for schizophrenia: a critical review of pharmacology and mechanisms of action of antipsychotic drugs. **Mol Psychiatry**. 2005; 10(1): 79–104.

Morimoto T, Yamamoto Y, Yamatodani A. Brain histamine and feeding behavior. **Behav Brain Res.** 2001; 124: 145-150.

Mullaney BC, Ashrafi K. *C. elegans* fat storage and metabolic regulation. **Biochimica et Biophysica Acta.** 2009; 1791(6): 474-478.

Murphy CT, McCarroll SA, Bargmann CI, Fraser A, Kamath RS, Ahringer J, Li H, Kenyon C. Genes that act downstream of DAF-16 to influence the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. **Nature.** 2003; 424(6946): 277-328.

Narbonne P, Roy R. *Caenorhabditis elegans* dauers need LKB1/AMPK to ration lipid reserves and ensure long-term survival. **Nature.** 2009; 457(7226): 210-214.

Nemoto S, Finkel T. Ageing and the mystery at Arles. **Nature.** 2004; 429: 149-152.

Ogg S, Paradis S, Gottlieb S, Patterson GI, Lee L, Tissenbaum HA, Ruvkun G. The Fork head transcription factor DAF-16 transduces insulin-like metabolic and longevity signals in *C. elegans*. **Nature.** 1997; 389(6654): 994-999.

O'Rourke EJ, Soukas AA, Carr CE, Ruvkun G. *C. elegans* major fats are stored in vesicles distinct from lysosome-related organelles. **Cell Metab.** 2009; 10(5): 430-435.

Padmavathi IJN, Rao KR, Venu L, Ganeshan M, Kumar KA, Rao ChN, Harishankar N, Ismail A, Raghunath M. Chronic maternal dietary chromium restriction modulates visceral adiposity: probable underlying mechanisms. **Diabetes.** 2010; 59: 98-104.

Paradis S, Ruvkun G. *Caenorhabditis elegans* Akt/PKB transduces insulin receptor-like signals from AGE-1 PI3 kinase to the DAF-16 transcription factor. **Genes Dev.** 1998; 12(16): 2488-2498.

Perez CL, Van Gilst MR. A ¹³C isotope labeling strategy reveals the influence of insulin signaling on lipogenesis in *C. elegans*. **Cell Metab.** 2008; 8(3): 266-274.

Pickar D. Prospects for pharmacotherapy of schizophrenia. **The Lancet.** 1995; 345 (8949): 557-562.

Pilowsky LS, Mulligan RS, Acton PD, Eil PJ, Costa DC, Kerwin RW. Limbic selectivity of clozapine. **Lancet**. 1997; 350(9076): 490-491.

Potkin SG, Keck PE Jr, Segal S, Ice K, English P. Ziprasidone in acute bipolar mania: a 21-day randomized, double-blind, placebo-controlled replication trial. **J Clin Psychopharmacol**. 2005; 25(4): 301-10.

Pouzet B, Mow T, Kreilgard M, Velschow S, Chronic treatment with antipsychotics in rats as a model for antipsychotic-induced weight gain in human. **Pharmacol Biochem Behav**. 2003; 75: 133-140.

Ramot D, Johnson BE, Berry TL Jr., Carnell L, Goodman MB. The Parallel Worm Tracker: a platform for measuring average speed and drug-induced paralysis in nematodes. **PLoS ONE**. 2008; 3: e2208.

Ranganathan R, Cannon, SC Horvitz, HR. MOD-1 is a serotonin-gated chloride channel that modulates locomotory behaviour in *C. elegans*. **Nature**. 2000; 408 (6811): 470-475.

Ratnaparkhi M, Mohanta GP, Upadhyay L. A typical antipsychotic: a review. **Int J Drug & Res**. 2010; 2(4): 879-885.

Reddy JK, Hashimoto T. Peroxisomal beta-oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor alpha: An adaptive metabolic system. **Annu Rev Nutr**. 2001; 21: 193-230.

Rehn AE, Rees SM. Investigating the neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia. **Clin Exp Pharmacol Physiol**. 2005; 32(9):687-696.

Riddle DL. The dauer larva, in "**The Nematode *Caenorhabditis elegans***" (Wood WB, ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. 1988; 393-412.

Rollema H, Lu Y, Schmidt AW, Sprouse JS, Zorn SH. 5-HT_{1A} receptor activation contributes to ziprasidone-induced dopamine release in the prefrontal cortex. **Biol Psychiatry**. 2000; 48(3): 229-237.

Rummel-Kluge C, Komossa K, Schwarz S, Hunger H, Schmid F, Lobos CA, Kissling W, Davis JM, Leucht S. Head-to-head comparisons of metabolic side effects of

second generation antipsychotics in the treatment of schizophrenia: a systematic review and meta-analysis. **Schizophr Res**. 2010; 123(2-3): 225-233.

Salway JG, Granner DK. **Metabolism at a glance**. Third edition, Blackwell publishing. 2004.

Sanyal S, Wintle RF, Kindt KS, Nuttley WM, Arvan R, Fitzmaurice P, Bigras E, Merz DC, Hébert TE, van der Kooy D, Schafer WR, Culotti JG, Van Tol HH. Dopamine modulates the plasticity of mechanosensory responses in *Caenorhabditis elegans*. **EMBO J**. 2004; 23(2):473-82.

Schafer WR, Kenyon CJ. A calcium-channel homologue required for adaptation to dopamine and serotonin in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**. 1995; 375: 73-78.

Seeger TF, Seymour PA, Schmidt AW, Zorn SH, Schulz D, Lebel LA, McLean S, Guanowsky V, Howard HR, Lowe III JA, Heym J. Ziprasidone (CP-88,059): A new antipsychotic with combined dopamine and serotonin receptor antagonist activity. **J Pharmacol Exp Ther**. 1995; 275(1): 101-111.

Seeman P, Lee T, Chau-Wong M, Wong K. Antipsychotic drug doses and neuroleptic/ dopamine receptors. **Nature**. 1976; 261: 717-719.

Seeman P, Corbett R, Van Tol HH. Atypical neuroleptics have low affinity for dopamine D2 receptors or are selective for D4 receptors. **Neuropsychoph**. 1997; 16(2):93-110; discussion 111-135.

Shobo M, Yamada H, Mihara T, Kondo Y, Irie M, Harada K, Ni K, Matsuoka N, Kayama Y. Two models for weight gain and hyperphagia as side effects of atypical antipsychotics in male rats: Validation with olanzapine and ziprasidone. **Behav Brain Res**. 2011; 216(2): 561-568.

Snigdha S, Thumbi C, GP Reynolds GP, JC Neill JC. Ziprasidone and aripiprazole attenuate olanzapine-induced hyperphagia in rats. **J Psychopharmacol**. 2008; 22 (5): 567-571.

Spanier B, Lasch K, Marsch S, Benner J, Liao W, Hu H, Kienberger H, Eisenreich W, Daniel H. How the Intestinal Peptide Transporter PEPT-1 Contributes to an Obesity Phenotype in *Caenorhabditis elegans*. **PLoS ONE**. 2009; 4(7): e6279.

Sprouse JS; Reynolds LS; Braselton JP; Rollema H; Zorn SH Comparison of the novel antipsychotic ziprasidone with clozapine and olanzapine: inhibition of dorsal raphe cell firing and the role of 5-HT_{1A} receptor activation. **Neuropsychopharmacology**. 1999; 5: 622-631.

Srinivasan S, Sadegh L, Elle IC, Christensen AG, Faergeman NJ, Ashrafi K. Serotonin regulates *C. elegans* fat and feeding through independent molecular mechanisms. **Cell Metab**. 2008; 7, 533-544.

Stahl SM, Shayegan DK. The psychopharmacology of ziprasidone: receptor-binding properties and real-world psychiatric practice. **J Clin Psychiatry**. 2003; 64 (Suppl 19): 6-12.

Steck AJ. Milestones in the development of neurology and psychiatry in Europe. **Schweizer Archiv fur Neurologie und Psychiatrie**. 2010; 161: 85-89.

Strange PG. Antipsychotic drugs: importance of dopamine receptors for mechanisms of therapeutic actions and side effects. **Pharmacol Rev**. 2001; 53(1): 119 -133.

Suo S, Kimura Y, Van Tol HH. Starvation induces cAMP response element-binding protein-dependent gene expression through octopamine-Gq signaling in *Caenorhabditis elegans*. **J Neurosci**. 2006; 26(40): 10082-10090.

Suo S, Culotti JG, Van Tol HHM. Dopamine counteracts octopamine signalling in a neural circuit mediating food response in *C. elegans*. **EMBO J**. 2009; 28: 2437-2448.

Sulston J, Dew M, Brenner S. Dopaminergic neurons in the nematode *Caenorhabditis elegans*. **J Comp Neurol**. 1975;163(2):215-26.

Sulston J, Hodgkin J. **The nematode *Caenorhabditis elegans***. Cold Spring Harbor Monographs Ser. No. 17, 587-590.

Sze JY, Victor M, Loer C, Shi Y and Ruvkun G. Food and metabolic signalling defects in a *Caenorhabditis elegans* serotonin-synthesis mutant. **Nature**. 2000; 403(6769): 560-564.

Tandon R, Harrigan E, Zorn SH. Ziprasidone: A novel antipsychotic with unique pharmacology and therapeutic potential. **J Serot Res**. 1997; 4: 159-177.

Tauscher J, Hussain T, Agid O, Verhoeff NP, Wilson AA, Houle S, Remington G, Zipursky RB, Kapur S. Equivalent occupancy of dopamine D1 and D2 receptors with clozapine: differentiation from other atypical antipsychotics. **Am J Psychiatry**. 2004; 161(9): 1620–1625.

Taylor DM, McAskill R. Atypical antipsychotics and weight gain: a systematic review. **Acta Psychiatr Scand**. 2000; 101(6): 416-432

Thakore JH. Metabolic disturbance in first-episode schizophrenia. **Br J Psychiatry**. 2004; 184 (Suppl 47): S76-S79.

The *C. elegans* Sequencing Consortium. Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. **Science**. 1998; 282(5386): 2012-2018.

Van Gilst MR, Hadjivassiliou H, Yamamoto KR. A *Caenorhabditis elegans* nutrient response system partially dependent on nuclear receptor NHR-49. **Proc. Natl. Acad. Sci**. 2005; 102(38): 13496-13501.

Vogel F, Gansmüller R, Leiblein T, Dietmaier O, Wassmuth H, Gründer G, Hiemke C. The use of ziprasidone in clinical practice: Analysis of pharmacokinetic and pharmacodynamic aspects from data of a drug monitoring survey. **European Psychiatry**. 2009; 4(3): 143-148.

Wang MC, Min W, Freudiger CW, Ruvkun G, Xie XS. RNAi Screening for Fat Regulatory Genes with SRS Microscopy. **Nat Methods**. 2011; 8(2): 135-138.

Wang MC, Rourke EJ, Ruvkun G. Fat metabolism links germline stem cells and longevity in *C. elegans*. **Science**. 2008; 322: 957-960.

Wang PW, Hill SJ, Childers ME, Chandler RA, Rasgon NL, Ketter TA. Open adjunctive ziprasidone associated with weight loss in obese and overweight bipolar disorder patients. **J Psychiatr Res**. 2011; 45(8): 1128-1132.

Watts JL. Fat synthesis and adiposity regulation in *Caenorhabditis elegans*. **Trends Endocrinol Metab**. 2009; 20(2): 58-65.

Wellman PJ, Davies BT, Morien A and McMahon L. Modulation of feeding by hypothalamic paraventricular nucleus alpha 1- and alpha 2-adrenergic receptors. **Life Sci**. 1993; 53(9): 669-679.

Wirshing DA, Wirshing WC, Kysar L, Berisford MA, Goldstein D, Pashdag J, Mintz J, Marder SR. Novel antipsychotics: comparison of weight gain liabilities. **J Clin Psychiatry**. 1999; 60(6): 358-363

Wood WB. (Ed.). **The nematode *Caenorhabditis elegans***. New York, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1988.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Obesity and overweight. 2008. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/index.html>>. Acesso em: 30 jul. 2011.

Yamada M, Miyakawa T, Duttatoroy A, Yamanaka A, Moriguchi T, Makita R, Ogawa M, Chou CJ, Xia B, Crawley JN, Felder CC, Deng CX, Wess J. Mice lacking the M3 muscarinic acetylcholine receptor are hypophagic and lean. **Nature**. 2001; 410 (6825): 207-212.

Yang JW, Lee EY, Kang KW. ErbB2 overexpression in p53-inactivated mammary epithelial cells. **FEBS Letters**. 2006; 580: 6501-6508.

Zhang SJ, Zou M, Lu L, Lau D, Ditzel DA, Delucinge-Vivier C, Aso Y, Descombes P, Bading H. Nuclear calcium signaling controls expression of a large gene pool: identification of a gene program for acquired neuroprotection induced by synaptic activity. **PLoS Genet**. 2009; 5: e100060.