

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
UNIDADE ACADÊMICA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

FELIPE DAMÁZIO PACHECO

**ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS EM RATOS SUBMETIDOS AO
MODELO ANIMAL DE ESQUIZOFRENIA INDUZIDO POR
CETAMINA E À PRIVAÇÃO MATERNA**

Dissertação de Mestrado
apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Ciências da Saúde,
para obtenção do título de Mestre
em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof. Dra. Alexandra
Ioppi Zugno

Co- orientador: Prof. Dr. João
Luciano de Quevedo

**CRICIÚMA
2012**

P116a Pacheco, Felipe Damázio.

Alterações bioquímicas em ratos submetidos ao modelo animal de esquizofrenia induzido por cetamina e à privação materna / Felipe Damázio Pacheco ; orientadora: Alexandra Ioppi Zugno ; co-orientador: João Luciano de Quevedo. – Criciúma : Ed. do Autor, 2012.

67 f. : il. ; 21 cm.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2012.

1. Esquizofrenia. 2. Privação dos pais. 3. Cetamina.
4. Estresse oxidativo. I. Título.

FOLHA INFORMATIVA

Esta dissertação foi elaborada segundo o estilo Vancouver e será apresentada no formato tradicional.

Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Neurociências e do Laboratório de Fisiopatologia do Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde.



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC

Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão

Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)

Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria N° 1.919 de 03.06.2005

PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado) reuniram-se para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado apresentada pelo candidato **Felipe Damázio Pacheco** sob o título **“Alterações bioquímicas em ratos submetidos à privação materna e ao modelo animal de esquizofrenia induzido por cetamina”** para obtenção do grau de **MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE** do Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

Após haver analisado o referido trabalho e arguido o candidato, os membros são de parecer pela **“APROVAÇÃO”** da Dissertação, com conceito B.

Criciúma, SC, 19 de dezembro de 2012

Prof. Dr. Cláudio Teodoro de Souza
Membro Relator

Prof. Dr. Marcos Marques da Silva Paula
Membro Interno

Prof. Dr. Silvio Ayala Junior
Membro Externo

Prof. Dra. Alexandra Ioppi Zugno
Orientador

Prof. Dr. Emilio Luiz Streeck
Coordenador do PPGCS

A Zenir de Oliveira Damásio (*in memoriam*)

*1922

+ 2005

Sua luta não foi em vão!

AGRADECIMENTOS

Tentarei ser sucinto nos agradecimentos, pois sempre acabamos sendo injustos. Vivemos num mundo interconectado, se justos devêssemos ser, então agradeceríamos a todo o Universo.

Agradeço à minha família, meu pai, minha mãe, minhas duas irmãs Cristina e Letícia. Todos eles deram alguma importante contribuição emocional ou mesmo material, ou algum tipo de sacrifício, os quais foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Agradeço a Deus, sem o qual nada seria possível.

Agradeço à minha orientadora, a Dra. Alexandra Ioppi Zugno. Tu me recebeste de braços abertos! E tua dedicação à pesquisa e a esta Universidade é digna de admiração.

Agradeço, por fim, à Josiane Budni, que foi fundamental neste trabalho: com certeza não teríamos produzido conhecimento de tão alta qualidade, se não fossem suas ações precisas e suas ideias brilhantes!

"O oposto de uma afirmação correta é uma afirmação falsa. Mas o
oposto de uma
verdade profunda pode ser outra verdade profunda"

Niels Bohr

RESUMO

Esquizofrenia é um dos mais debilitantes transtornos mentais, afetando 1% da população mundial. Experiências adversas da vida precoce influenciam o desenvolvimento do sistema nervoso afetando o comportamento durante a vida adulta, e estas experiências são consideradas na patogênese de transtornos psiquiátricos como a esquizofrenia. O presente estudo investigou alterações bioquímicas em ratos submetidos à privação materna e/ou administração de cetamina na idade adulta. Ratos adultos machos foram submetidos à privação materna durante 180 minutos do primeiro dia pós-natal até o décimo dia pós-natal. Nós avaliamos os níveis de neurotrofinas, estresse oxidativo, atividade dos complexos I, II, II- III e IV da cadeia respiratória mitocondrial, atividade de enzimas do ciclo de Krebs e atividade da creatina cinase no córtex pré-frontal, hipocampo e estriado de ratos adultos machos privados maternalmente ou não e administrados com salina ou doses subanestésicas agudas de cetamina (5 mg/kg, 15 mg/kg ou 25 mg/kg, i.p.), as quais mimetizam um modelo animal de esquizofrenia. Os resultados mostram que a administração de cetamina associada à privação materna reduziu os níveis de NGF, mas não de BDNF no hipocampo. A privação materna *per se* induziu aumento de TBARS no córtex pré-frontal e hipocampo. Privação materna *per se* e em associação à cetamina (5, 15 ou 25 mg/kg) induziu diminuição das proteínas carboniladas no hipocampo. Além disso, a privação materna *per se* ou associada à cetamina provocou aumento da atividade dos complexos mitocondriais II, II-III e IV e alteração da enzima envolvida no ciclo de Krebs (succinato desidrogenase) e creatina cinase em diferentes regiões cerebrais. Nossos dados indicam que a privação materna e/ou cetamina pode induzir alterações nos níveis de neurotrofinas (NGF e BDNF), dano oxidativo (TBARS e proteínas carboniladas), das enzimas importantes no metabolismo energético (creatina cinase e a succinato desidrogenase) e dos complexos II, II-III e IV da cadeia respiratória mitocondrial. Todos estes resultados sugerem que a privação materna sozinha ou associada com diferentes doses de cetamina (5, 15 e 25 mg/kg) pode ser um fator de risco para alterações bioquímicas tipo-esquizofrenia.

Palavras-chave: esquizofrenia; privação materna; cetamina; neurotrofinas; estresse oxidativo; cadeia respiratória mitocondrial

ABSTRACT

Schizophrenia is one of the most disabling mental disorders that affects up to 1% of the population worldwide. Adverse experiences in early life profoundly influence the developing nervous system, and also affect human behaviour during adult life and are considered in the pathogenesis of psychiatric disorders such as schizophrenia. The present study investigated biochemical alterations in rats following maternal deprivation and/or ketamine treatment in adulthood. Male rats were subjected to maternal deprivation for 180 min from (Postnatal day) PND-01 to PND-10. We evaluated neurotrophins' levels, oxidative stress, mitochondrial respiratory chain complex I, II, II-III and IV activity, Krebs cycle enzymes and creatine kinase activity in the prefrontal cortex, hippocampus and striatum of adult male rats deprived or not that were administered with saline or acute ketamine sub anesthetic doses (5 mg/kg, 15 mg/kg and 25 mg/kg, i.p.), which serves as an animal model of schizophrenia. The results showed that ketamine administration reduced the NGF, but not BDNF levels in the hippocampus. Maternal deprivation *per se* induced increase of TBARS in the prefrontal cortex and hippocampus and it associate with ketamine (5, 15 or 25 mg/kg) induced reduction of carbonyl protein levels. Moreover, maternal deprivation *per se* or associate to ketamine provoke increase of activity of mitochondrial II, II-III and IV and alteration of Krebs cycle enzyme (succinate dehydrogenase) and creatine kinase in different regions of brain. Altogether, these results indicated that maternal deprivation and/or ketamine might induce alteration in neurotrophins (NGF and BDNF) levels, oxidative stress (TBARS and carbonyl protein), crucial enzymes in the energetic metabolism (creatine kinase and succinate dehydrogenase) and complex II, II-III and IV activity of mitochondrial respiratory chain. All these results suggest that maternal deprivation alone or associated with different doses of ketamine (5, 15 e 15 mg/kg) might be a risk factor to biochemical schizophrenia- like alterations.

Keywords: schizophrenia; maternal deprivation; ketamine; neurotrophin; oxidative stress; mitochondrial respiratory chain

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AKT- Proteína cinase B
AMPA- (receptor de) ácido alfa-amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico
APA - American Psychiatric Association – Associação Americana de Psiquiatria
ATP - Adenosine Triphosphate - Trifosfato de Adenosina
BDNF- Brain-Derived Neurotrophic Factor/ Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
Complexo I - NADH-ubiquinona oxidorreductase;
Complexo II - succinato-ubiquinona oxidorreductase;
Complexo III- ubiquinol-citocromo c oxidorreductase;
Complexo IV- citocromo c oxidase
Complexo V- ATPsintetase.
CREB- cAMP response element-binding protein / proteína ligante de resposta ao AMP cíclico
DISC-1- (gene of) Disrupted in Schizophrenia 1 (protein) / (gene da proteína) Disfuncionante na Esquizofrenia 1
DSM-IV - Manual de Diagnóstico e Estatística dos Transtornos Mentais
ERK- extracellular-signal-regulated kinase / cinase regulada por sinal extracelular
ERN- Espécies reativas de nitrogênio
ERO - Espécies reativas de oxigênio
GABA - Gamma-amino butyric acid /ácido gama-amino butírico
GSK-3 - Glycogen synthase kinase 3 / glicogênio sintetase cinase
NADH - Hidreto de nicotinamida adenina dinucleotídeo
NGF- Nerve Growth Factor / Fator de Crescimento Neuronal
NMDA- (receptor de) N-metil-D-aspartato
OMS /WHO - Organização Mundial da Saúde / World Health Organization
PI3-Cinase - fosfatidilinositol 3-cinase
Ras -“rat sarcoma” family of proteins –família de proteínas de “sarcoma de ratos”
SNC - Sistema Nervoso Central
TBARS - thiobarbituric acid reactive substances / espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
TrkB - Tropomyosin receptor kinase B- Receptor cinase tropomiosina B
YLD - Years lost due to disability – anos perdidos por incapacidade

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 EPIDEMIOLOGIA, DIAGNÓSTICO, TRATAMENTO	19
1.2 FISIOPATOLOGIA	20
1.2.1 Genética	22
1.2.2 Neurodesenvolvimento	24
1.2.3 Neurotrofinas	26
1.2.4 Estresse Oxidativo	27
1.2.6 Receptores de glutamato e modelo animal de esquizofrenia ...31	
1.2.7 Esquizofrenia e Privação Materna	32
2 OBJETIVOS	34
2.1 OBJETIVO GERAL	34
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
3 METODOLOGIA	35
3.1 ANIMAIS	35
3.2 PRIVAÇÃO MATERNA	35
3.3 CETAMINA	36
3.4 DESENHO EXPERIMENTAL	36
3.5 DOSAGENS BIOQUÍMICAS	37
3.5.1 Níveis de BDNF e NGF	37
3.5.2 Formação de espécies reativas do Ácido Tiobarbitúrico37	
3.5.3 Carbonilação de Proteínas	37
3.5.4 Atividade da creatina cinase	38
3.5.5 Atividade da malato desidrogenase	38
3.5.6 Atividade da succinato desidrogenase	38
3.5.7 Atividade dos Complexos da Cadeia Mitocondrial	38
3.5.8 Determinação de proteínas	39
4. RESULTADOS	40
4.1 NÍVEIS DE NGF E BDNF.....	40
4.2 NÍVEIS DE TBARS E PROTEÍNAS CARBONILADAS	41
4.3 ATIVIDADE DA CREATINA CINASE	43
4.4 ATIVIDADE DA MALATO DESIDROGENASE E SUCCINATO DESIDROGENASE	43
4.5 ATIVIDADE DA DOS COMPLEXOS I, II, III E IV DA CADEIA RESPIRATÓRIA MITOCONDRIAL	45
5 DISCUSSÃO	48
6 CONCLUSÃO	55
REFERÊNCIAS	56

1 INTRODUÇÃO

1.1 EPIDEMIOLOGIA, DIAGNÓSTICO, TRATAMENTO

A Esquizofrenia é um transtorno psiquiátrico grave que afeta em torno de 1% da população mundial (McGrath et al., 2008). Em 2004 a OMS (Organização Mundial da Saúde) listou a Esquizofrenia como a 14ª causa de incapacidade em todo o mundo, com 16,7 milhões de pacientes “moderada e severamente” incapacitados (WHO, 2004). A OMS fornece ainda o índice YLD (*years lost due to disability*, “anos perdidos por incapacidade”) que classifica a esquizofrenia como a 6ª maior causa de incapacidade no mundo (WHO, 2004). Contudo, mesmo em países desenvolvidos a reinserção social dos esquizofrênicos continua uma questão de saúde pública (Thornicroft, 2004). A fisiopatologia da doença não está totalmente elucidada. A Esquizofrenia, assim como os transtornos psiquiátricos em geral, tem origem multifatorial e seu diagnóstico, até o momento, é clínico, ou seja: baseia-se na descrição dos sintomas, e não em alterações fisiopatológicas (Tandon et al., 2008). De acordo com o DSM-IV (Manual de Diagnóstico e Estatística dos Transtornos Mentais), os sintomas da esquizofrenia podem ser classificados como: sintomas positivos (alucinações, delírios, agitação psicomotora e desconfianças), negativos (embotamento afetivo, isolamento social, falta de iniciativa, falta de prazer, discurso empobrecido, além da desorganização) e desorganizados (comportamento, pensamento, afeto inapropriado) (APA, 1994).

É importante ressaltar que as alucinações (alterações da percepção) e os delírios (alterações do pensamento) têm amplo diagnóstico diferencial, estão presentes em outros transtornos psiquiátricos e orgânicos, inclusive podendo ser menos graves e de melhor prognóstico (Verdoux e Van Os, 2002). Além disso, a esquizofrenia é tão-somente a mais grave entre as várias condições psiquiátricas com sintomas semelhantes em menor grau, chamadas em conjunto *espectro da esquizofrenia*. Entre elas, estão a Síndrome de Asperger, o Transtorno Esquizoafetivo, Transtorno de Personalidade Esquizoide, e outros. Há indícios de agregação familiar das doenças dentro desse espectro (Tienari et al., 2004).

Devemos fazer a ressalva de que existe grande variabilidade no curso da doença e na sua gravidade entre os pacientes: há pacientes com início na infância ou na quarta década, nas mulheres a prevalência é ligeiramente menor, a idade de início mais tardia e frequentemente a

doença é mais branda (Canuso e Pandina, 2007). O prognóstico quanto aos sintomas negativos costuma depender do funcionamento pré-mórbido (Golembo-Smith, 2012). Atualmente, a melhora dos desfechos (por exemplo, tempo e frequência de internações) é incontestavelmente melhor com uso de antipsicóticos do que sem tratamento (Leucht et al., 2012). No entanto, ainda assim ocorrem recaídas em longo prazo (Torgalsboen, 1998).

Os sintomas residuais são em geral incapacitantes e têm impacto considerável na qualidade de vida tanto de pacientes quanto de cuidadores (Thornicroft et al., 2004). Os clínicos tentam prescrever combinações de medicamentos em casos refratários, muitas vezes sem a devida validação em estudos randomizados duplo-cegos (Janssen et al., 2004). A adesão ao tratamento é dificultada pelos efeitos colaterais dos antipsicóticos e pelos sentimentos do paciente em relação ao tratamento e aos profissionais de saúde (Murawiec, 1999).

Para explicar a fisiopatologia deste transtorno muitas hipóteses surgiram. A hipótese dopaminérgica foi elaborada a partir da investigação do mecanismo de ação dos primeiros antipsicóticos chamados de “típicos” (por exemplo, clorpromazina, haloperidol) que agem bloqueando o receptor de dopamina D2 (López, 2005). Existe um déficit de função nos receptores D1 no córtex pré-frontal, à qual se contrapõe uma ação exacerbada dos receptores D2 no estriado (Laruelle et al., 2003). Em consequência, surgem sintomas psicóticos em decorrência de hiperatividade do estriado (e do sistema límbico) e sintomas negativos devido à hipoatividade do córtex pré-frontal (fig 1). Buscando melhora nos sintomas negativos, pesquisou-se a ação dos receptores de serotonina. Desenharam-se a partir desses estudos os antipsicóticos *atípicos* (em oposição aos *típicos* que agem apenas em receptores dopaminérgicos como alvo terapêutico). Os antipsicóticos atípicos visam bloquear, além do receptor D2 (em menor grau), os receptores 5-HT2 (Alex et al., 2005). Parte-se do pressuposto de que o bloqueio de 5-HT2 melhoraria os sintomas negativos e bloqueio de receptores D2 com menor intensidade (ou menor duração) aliviaria os sintomas positivos, com menos efeitos colaterais (Keefe et al., 1999). No entanto, recente ensaio clínico não demonstrou diferença significativa nos efeitos colaterais extrapiramidais, tais como síndrome parkinsoniana e discinesia tardia (Peluso et al, 2012).

1.2 FISIOPATOLOGIA

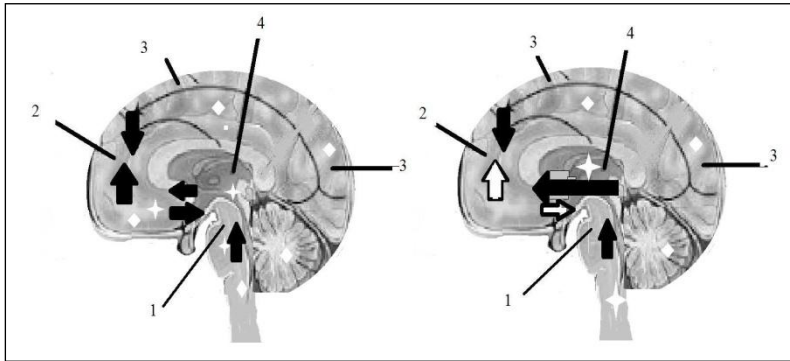
O conhecimento mais detalhado da fisiopatologia é fundamental para triar pacientes que terão diferentes prognósticos (não se sabe quais evoluirão melhor, ou quais responderão melhor ao tratamento) e especialmente para desenvolver tratamentos mais eficazes. O antagonismo do receptor D2 é propriedade unificadora de todos os antipsicóticos em uso na Esquizofrenia (Laruelle et al., 2003). São efetivos em melhorar a psicose, porém, pouco efetivos em tratar sintomas negativos e cognitivos. Atualmente os estudos estão focados na complexa genética deste transtorno, e vias de sinalização celular implicadas em sua fisiopatologia. Os sistemas de neurotransmissão envolvidos, além do dopaminérgico (em associação com serotoninérgico, já abordado pelos antipsicóticos atípicos) são: o sistema glutamatérgico, neurônios gabaérgicos e colinérgicos, sendo estes três sistemas intimamente associados em suas vias (Carlsson et al., 2001).

A sequência de eventos com dano cerebral que leva à esquizofrenia é resultado da soma de fatores genéticos e ambientais, desde a vida intrauterina (fig 3). Fatores como infecção materna e hipóxia perinatal iniciam um processo de insulto cerebral que compromete o neurodesenvolvimento (Brown, 2011).

Durante o seu crescimento, ainda, a criança sofre experiências adversas que influenciam o desenvolvimento do sistema nervoso, afetando o comportamento durante a vida adulta (Bowby, 1951). Esta influência é mediada por mudanças proteômicas (nas proteínas celulares) e genômicas (na expressão ou supressão de genes) nos neurônios mediadas pela resposta ao estresse crônico (Fuchikami, 2010).

O estresse pode ser definido como o processo de adaptação de um organismo a estímulos externos. Em especial no caso de animais mamíferos, estímulos psicológicos podem ser percebidos como agradáveis ou ameaçadores à vida; sendo, portanto, uma causa de estresse (McEwen, 2000). A função do cortisol é facilitar a reação de “luta ou fuga” através de diversos mecanismos, como a gliconeogênese e atividade antiinflamatória (Beatty, 1970; Khani e Tayek, 2001). As alterações do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal têm sido extensivamente estudadas em transtornos mentais, especialmente na depressão (Réus et al., 2011). Na esquizofrenia, supõe-se que estas alterações possam ser aditivas ao processo de dano neuronal já em curso, contribuindo para a patogênese do transtorno.

Figura 1- Disconectividade entre as estruturas cerebrais na Esquizofrenia.



À esquerda, representação de um cérebro de indivíduo controle normal, no qual o córtex pré-frontal (2) comunica-se reciprocamente com as demais regiões do córtex (3) e com o sistema límbico e estriado (4). A dopamina \blacksquare é produzida no mesencéfalo (1) e distribuída para o sistema límbico e o córtex, em vias com funções específicas. Já o GABA e o glutamato \blacklozenge agem em todo SNC. À direita, representação das alterações na esquizofrenia: há diminuição de dopamina e disfunções de GABA e de glutamato no córtex pré-frontal, comprometendo sua ação regulatória sobre o sistema límbico/estriado e o restante do córtex (flechas em branco). Existe hiperfunção dopaminérgica no sistema límbico (flecha em destaque) levando aos surtos de psicose. Esquema modificado de www.adhd-guides.blogspot.com

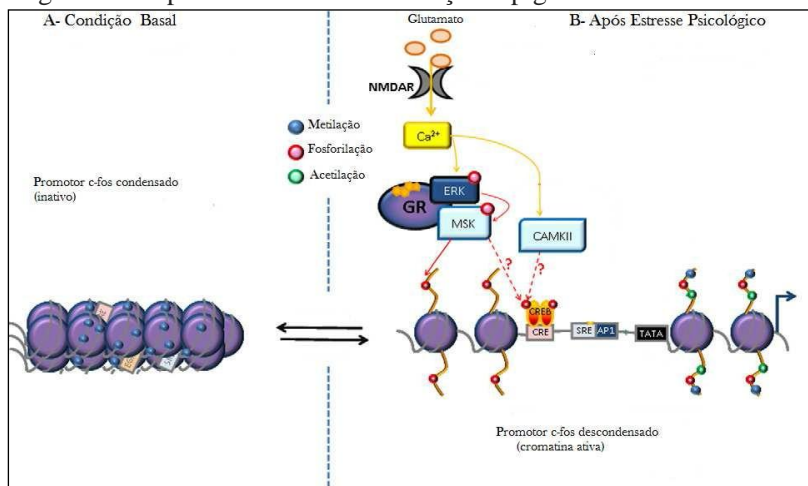
1.2.1 Genética

Os genes mais estudados em relação à Esquizofrenia são os do cromossomo 22q11, o gene da proteína DISC1, o gene da Neurorregulina 1/ErbB4, e de componentes da via Akt/GSK-3 (Karam et al. 2010). Centenas de genes, correspondendo a regiões de cromossomos, foram estatisticamente associados à esquizofrenia, mas eles não estão alterados em todos os pacientes esquizofrênicos (Hovatta et al., 1998). Não existe, portanto, um único padrão de alterações genéticas que leve à esquizofrenia. Existe uma relação entre padrões genéticos de pacientes com esquizofrenia e pacientes com transtornos do humor, e considerável sobreposição entre esses padrões. A heterogeneidade prognóstica e variabilidade das associações epidemiológicas e genéticas parecem na verdade ser manifestações de mais de uma “doença” convergindo para uma mesma “síndrome” (Craddock e Owen, 2010).

Comparando-se estudos de genética em humanos com modelos animais de esquizofrenia, faz-se a hipótese de que a susceptibilidade à Esquizofrenia seja resultante de alterações no sistema glutamatérgico, nos potenciais de longo prazo, aumento no estresse oxidativo e viabilidade dos oligodendrócitos (Carter, 2006).

A regulação da expressão ou supressão de genes é complexa, e pode ser modificada conforme as condições do ambiente intracelular. Esta regulação, chamada de *epigenética*, é responsável pela interação entre os genes e o meio ambiente durante o neurodesenvolvimento (Mifsud et al., 2011). Os receptores intracelulares de cortisol (liberado durante o estresse) e os receptores de membrana de glutamato (como o NMDA) estão envolvidos na sinalização de reações agudas ao estresse, intermediado pelo cálcio e diversas proteínas que levam a modificações na transcrição gênica e comportamentos adaptativos (fig2). Já no estresse crônico, o aumento repetido do cortisol causa dano neuronal (Lee et al., 2002).

Figura 2- Resposta ao estresse e alterações epigenéticas



Intersecção entre o sistema glutamatérgico e a resposta ao estresse, a qual pode estar implicada na esquizofrenia. O glutamato se liga ao receptor NMDA resultando em aumento do cálcio intracelular. Este desencadeia uma série de cascatas de sinalização incluindo a Cálcio-Calmodulina Cinase (CAMKII) e a Cinase Regulada por Sinal Extra-Celular (ERK). A ERK utiliza o receptor de glicocorticoide (GR) como apoio para fosforilar as demais enzimas. A ativação da ERK ativa a transcrição de genes que levam a comportamentos adaptativos ao estresse agudo, tais como a imobilidade em

resposta ao nado forçado (Chandramohan et al., 2008). Esquema adaptado de Mafsud et al., 2011.

1.2.2 Neurodesenvolvimento

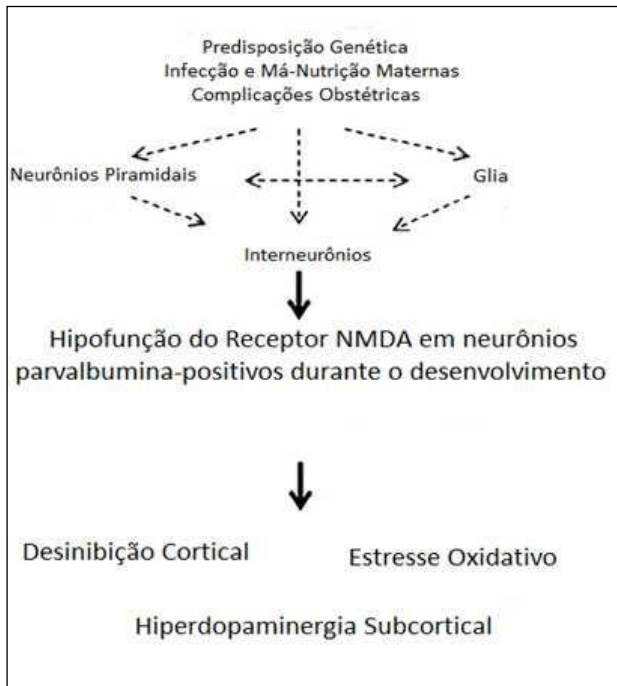
Os estudos de imagem e a observação clínica dos pacientes ao longo da vida levaram, primeiramente, a uma hipótese neurodegenerativa para a esquizofrenia, a qual remonta a Kraepelin (1921), que a caracterizou como “Demência Precoce”.

Estudos em animais, além das inferências epidemiológicas em humanos, acrescentaram à ideia de “demência” a hipótese neurodesenvolvimental, que pressupõe o surgimento do transtorno por uma combinação de fatores genéticos e ambientais (McGrath et al., 2003). Observou-se uma série de fatores evitáveis associados com a esquizofrenia, especialmente relacionados com a gestação, o parto, e diversos fatores ambientais desde a infância até o final da adolescência, quando comumente pode surgir o primeiro surto psicótico (Brown, 2011). Entre esses fatores, destacam-se infecções maternas (Clarke et al., 2009; Brown e Derkitis, 2009), fumo durante a gravidez (Boutwell e Beaver, 2010), menor espaço entre as gestações (Gunawardana et al., 2011) hipóxia perinatal (Cannon et al., 2002), ambiente urbano (Van Os, 2004), maiores níveis de estresse (Brown, 2011) e uso de *cannabis* na adolescência (Henquet et al., 2005).

Outros estudos, ainda, comprovaram que o funcionamento cognitivo e social pré-mórbido é, em média, pior do que o de controles. Golembo-Smith e colaboradores (2012) demonstraram concordância de 73% (24 de 33 pacientes) no algoritmo de prognóstico baseado em caracteres pré-mórbidos e no desenvolvimento posterior de transtornos do espectro da esquizofrenia. Tais caracteres incluíam anormalidades físicas menores, quociente de inteligência, história familiar, coordenação da musculatura esquelética e ocular, e lateralidade cerebral. A hipótese neurodesenvolvimental postula que a esquizofrenia é consequência de alterações no SNC induzidas por fatores ambientais desde o desenvolvimento embrionário e progredindo pela infância, adolescência e idade adulta, em combinação com um conjunto de genes predisponentes. Tantos os fatores ambientais quanto genéticos podem ser diferentes em indivíduos com semelhantes transtornos (Tandon, 2008). A sequência de eventos no SNC que levaria ao quadro da esquizofrenia está para ser elucidada (fig 3). Em modelos animais, foram reproduzidos eventos que levam à hiperfunção dopaminérgica subcortical, à liberação cortical e ao estresse oxidativo,

os quais ocorrem na esquizofrenia em humanos (Laruelle et al, 2003). Neste modelo, predisposição genética, aliada a agressões ambientais no período gestacional, periparto e na infância, levariam à hipofunção do receptor NMDA, em especial em interneurônios inibitórios, levando a uma grave disconectividade entre as estruturas cerebrais (Mcquillen e Ferriero, 2004; Do et al., 2009).

Figura 3- Neurodesenvolvimento



Esquema integrando diversas hipóteses, em modelos animais, sobre a cadeia de eventos no neurodesenvolvimento em indivíduos que desenvolvem esquizofrenia. Traduzido de Nagazawa et al., 2012.

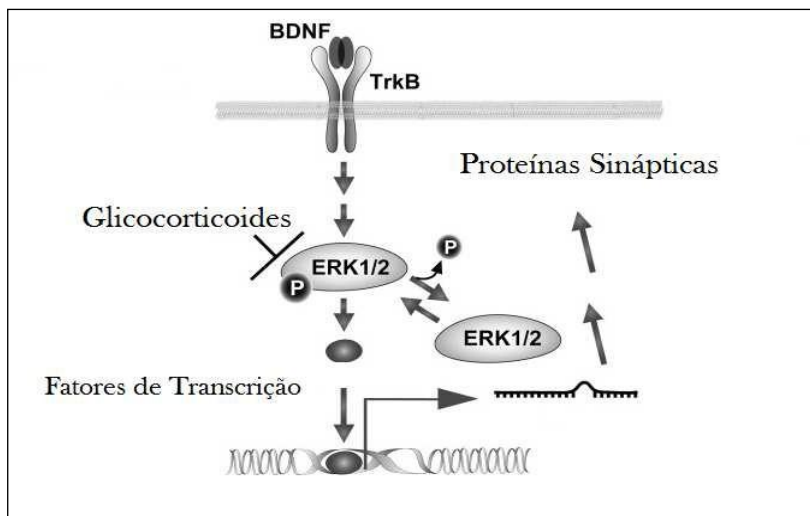
1.2.3 Neurotrofinas

As neurotrofinas (fig 4) apresentam papel fundamental em transtornos psiquiátricos com na esquizofrenia e nos transtornos de humor. As neurotrofinas são substâncias que, no SNC, são produzidas por neurônios pré-sinápticos para agir em receptores pós-sinápticos com ação neuroprotetora, inibidora da apoptose, ou mesmo desencadeando a neurogênese (Chao, 2003). Também tem um papel importante na consolidação da memória (Bekinschtein et al., 2007).

As Neurotrofinas são uma grande família de polipeptídeos que promovem o crescimento e diferenciação de neurônios em desenvolvimento no SNC e sistema nervoso periférico, bem como a sobrevivência das células neuronais em resposta ao estresse (Martinotti et al., 2012). Os receptores das neurotrofinas são da classe das tirosina-cinases, as quais iniciam uma cascata de fosforilação de proteínas, estimulando a via, por exemplo, da PI3-K (fosfoinositol-3 cinase) e da Ras/ERK/CREB (Chao, 2003).

As neurotrofinas também estão presentes em tecidos periféricos, e no sangue, sinalizando também para o crescimento e sobrevivência celular (Neveu e Arenas, 1996). Entre elas encontramos o BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor) e o NGF (Nerve Growth Factor) ambos peptídeos com ação em receptores de membrana do tipo tirosina-cinase (fig 4), o mesmo tipo de receptor da insulina (Soppet et al., 1991). O NGF também se encontra alterado em pacientes esquizofrênicos, considerando que um estudo de Perez-Polo et al. (1978) demonstrou que a atividade do NGF encontrou-se reduzida em soro, e um estudo de Klyushnik et al. (1999) demonstrou aumento de anticorpos anti-NGF em soro de pacientes esquizofrênicos.

Figura 4- Sinalização celular e neurotrofinas



Mecanismo de ação das neurotrofinas, ativando a transcrição gênica, e levando a produção de proteínas para novas sinapses. O estresse emocional pode inibir a sua ação através dos glicocorticóides. Traduzido de Numakawa et al., 2011

1.2.4 Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo é um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN) e a capacidade de defesa antioxidante do organismo (Bitanirwe & Woo, 2011). As mais importantes ERO são o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o radical superóxido (O_2^-) e o radical Hidroxila (OH^-). Espécies ERN incluem óxido nítrico (NO) e peroxinitrito ($ONOO^-$). O excesso de ERO, no entanto, pode ter efeitos deletérios tais como modificação de macromoléculas de ácidos nucleicos, proteínas e lipídios (Kohen e Nyska, 2002). A Peroxidação Lipídica é um efeito bem caracterizado das espécies reativas que resulta em dano para a membrana celular assim como para as organelas (Horton e Fairhurst, 1987). Modificação de proteínas por ERO e ERN pode induzir desnaturação de proteínas tornando-as disfuncionais (Grune et al., 1997). Além disso, a morte celular é regulada por

enzimas que podem ser ativadas pelo excesso de espécies reativas, associadas à disfunção mitocondrial (Scherz-Shouval e Eliazar, 2007).

O cérebro é particularmente vulnerável a dano oxidativo, dado que possui relativamente poucos antioxidantes, mas com alto conteúdo de metais que podem catalisar a formação das espécies reativas (McQuillen e Ferriero, 2004). Em seres humanos com esquizofrenia, o estresse oxidativo também é detectado no soro e em estruturas cerebrais (Zhang et al., 2010). O Estresse oxidativo ocorre durante o neurodesenvolvimento, tanto como causa como consequência do processo inflamatório, perda de defesas antioxidantes e disfunção mitocondrial (Bitanhirwe e Woo, 2011). Tal processo resulta em disfunção das membranas neuronais, levando à perda de ácidos graxos poliinsaturados de membrana (Khan et al., 2002), e afeta a sinalização celular comprometendo a formação de sinapses (Do et al., 2004; Do et al., 2009).

1.2.5 Disfunção mitocondrial e anormalidades no metabolismo energético

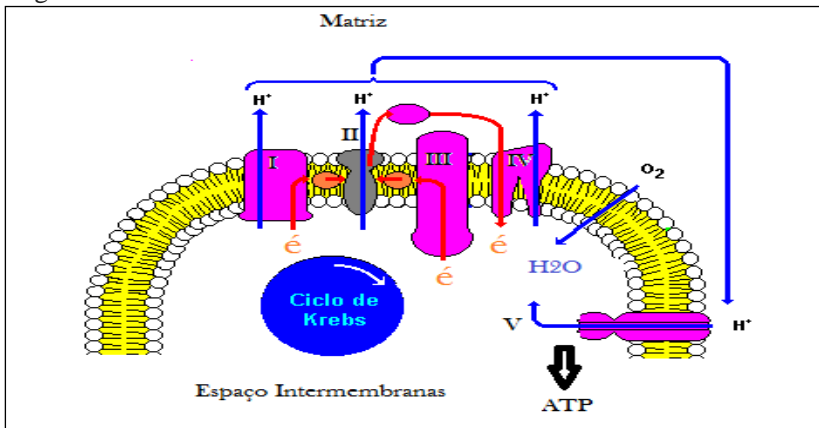
Os neurônios são altamente dependentes do ATP (adenosina trifosfato) mitocondrial anaeróbico para a manutenção de suas funções fisiológicas (fig 5). O Ca^{2+} (cálcio) intracelular, regulado pelas mitocôndrias, é muito importante para a geração de potenciais de ação em processos de sinalização, transmissão sináptica, dinâmica do citoesqueleto e regulação da expressão gênica (Yadava e Nichols, 2007). As deficiências genéticas mais comuns são as do complexo I (Loeffen et al., 2000), e embora raros, há casos em que as manifestações psiquiátricas não só estão presentes como precedem as alterações em outros sistemas, dificultando em muito o diagnóstico (Hughes e Hanna, 1999).

Alterações na função mitocondrial foram encontradas em pacientes com transtornos psicóticos, o que chamou a atenção para o papel da disfunção mitocondrial na gênese da esquizofrenia (Manatt e Chandra, 2011). A disfunção mitocondrial está envolvida no processo fisiopatológico que leva à desconectividade na esquizofrenia (Ben-Shachar e Laifenfeld, 2004).

O ciclo de Krebs (fig 6) é um conjunto supramolecular de 8 enzimas : citrato sintase, aconitase, isocitrato desidrogenase, o complexo α -cetoglutarato desidrogenase, succinato tiocinase, succinato desidrogenase, fumarase e malato desidrogenase, e a inativação de uma destas enzimas pode prejudicar a bioenergética mitocondrial

(Lyubarev e Kurganov, 1989;Vélot et al., 1997). Consistente com isso, Bubber et al. (2011) mostrou que em cérebro *post-mortem* de pacientes esquizofrênicos houve redução da atividade das enzimas da primeira metade do ciclo de Krebs (aconitase, α -cetoglutarato desidrogenase, succinato tiocinase) e aumento na atividade das enzimas da segunda metade desta rota metabólica (succinato desidrogenase e malato desidrogenase), porém não houve alterações na atividade da piruvato desidrogenase, citrato sintase, isocitrato sintase e fumarase.

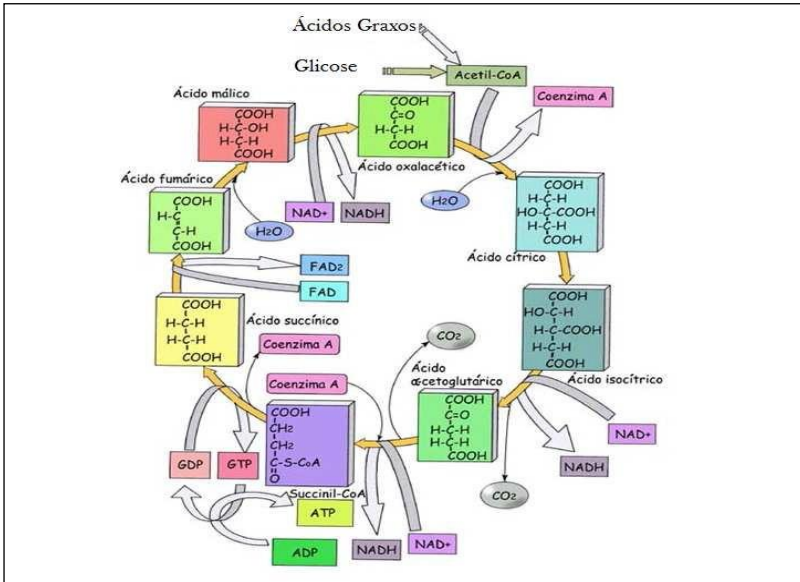
Figura 5- Mitocôndria



A produção de ATP se realiza através do transporte de elétrons através de uma série de 4 complexos proteínas de membrana, e do transporte de íons H^+ que estes mesmos complexos liberam para o espaço entre membranas da mitocôndria. Com o transporte de prótons, cria-se um gradiente elétrico e químico, e os prótons retornam para a matriz através do poro da enzima ATPsintase (complexo 5), sendo que é o fluxo dos prótons que fornece energia para a síntese do ATP. Quanto aos elétrons, estes são doados para o oxigênio no complexo 4, o qual ao mesmo tempo, em condições ideais, deve ligar-se a 2 prótons, formando a molécula de água. No entanto, o oxigênio molecular (O_2) pode aceitar os 2 elétrons tornando-se o íon superóxido ($O_2^{\cdot -}$) e não formar o H_2O , mas ao invés, substâncias altamente reativas como H_2O_2 (peróxido de hidrogênio), NO (óxido nítrico) ou os radicais livres (Voet et al., 2004). Estes vêm a ser substâncias com elétron não-pareado, “necessitando” ligar-se a outra molécula imediatamente. Complexo I: NADH-ubiquinona oxidorreductase; Complexo II: succinato- ubiquinona oxidorreductase; Complexo III: ubiquinol-citocromo c oxidorreductase; Complexo IV: citocromo c oxidase; Complexo V: ATPsintetase.

http://recursostic.educacion.es/ciencias/biosfera/web/alumno/2bachillerato/Fisiologia_celular/contenidos4.htm

Figura 6- Ciclo de Krebs



Alterações no ciclo de Krebs podem alterar profundamente a taxa de produção de radicais livres. Piruvato, o produto da glicólise é descarboxilado a acetil-Coenzima A (CoA) pelo complexo piruvato desidrogenase. A conversão da acetil CoA para CO_2 no ciclo de Krebs resulta na produção de equivalentes redutores para a cadeia transportadora de elétrons e subsequentemente produção de ATP. http://recursostic.educacion.es/ciencias/biosfera/web/alumno/2bachillerato/Fisiologia_celular/contenidos4.htm

A enzima creatina quinase está envolvida na estocagem de fosfatos de alta energia produzidos pela mitocôndria, ou seja, catalisa a transferência reversível do grupo N-fosforil da fosfocreatina para ADP, regenerando o ATP (Pilla et al., 2003). Há indícios de que a atividade desta enzima esteja alterada em diversas patologias (Wyss e Kaddurah-Daouk, 2000; Pilla et al., 2003).

Neste sentido, Burbaeva et al. (2003), verificou uma diminuição desta enzima em tecido cerebral *post mortem* de pacientes esquizofrênicos, sugerindo que essa diminuição esteja associada à disfunção energética cerebral presente na esquizofrenia. Uma questão a considerar neste estudo é que o uso de neurolépticos pelos

pacientes pode ter influenciado nesses resultados.

1.2.6 Receptores de glutamato e modelo animal de esquizofrenia

Os receptores de glutamato estão distribuídos por todo o SNC e normalmente eles coexistem nos mesmos neurônios que outros receptores: serotonina, dopamina e acetilcolina (Carlsson et al., 2001). Três dos grupos de receptores levam o nome dos principais agonistas sintéticos: AMPA (α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propionato), cainato e NMDA (N- Metil-D-Aspartato) (Dingledine et al., 1999). Estas três classes de receptores são chamadas de receptores *ionotrópicos*, pois regulam a entrada de íons. Além disso, existem os chamados receptores *metabotrópicos*, que são receptores ligados à Proteína G. Todos têm efeitos na plasticidade sináptica, contribuindo para a formação da memória (Rodrigues et al., 2002).

O efeito do glutamato nos neurônios em geral é excitatório, portanto há aumento da atividade metabólica (Petroff, 2002). Este efeito excitatório é contrabalançado pelo efeito inibitório dos receptores de ácido gama amino-butírico (GABA), sendo o equilíbrio entre ambos, fundamental para a homeostase do SNC. Uma classe importante de sedativos, os benzodiazepínicos, agonistas dos receptores GABA, tem como efeito colateral a amnésia (Watanabe et al., 2002). Assim como em outros transtornos psiquiátricos, existe também disfunção do sistema gabaérgico, sendo que há modelos animais mostrando falta de interneurônios gabaérgicos levando ao desequilíbrio entre córtex e sistema límbico, como ocorre em humanos com o transtorno (Nakazawa et al., 2012).

O sistema glutamatérgico atua como um controlador cortical da liberação de monoaminas, seja por um estímulo positivo através de neurônios glutamatérgicos ou através de neurônios gabaérgicos (inibitórios) usados como freio, utilizando parcialmente vias de feedback do estriado e do tálamo (Carlsson et al., 2001). Diversos estudos mostram que existem alterações da função glutamatérgica no cérebro de pacientes com esquizofrenia em relação a controles (Meador-Woodruff et al., 2000).

Até o momento não há um modelo ideal para reprodução da esquizofrenia em animais (Ellenbroek & Riva, 2003). No presente estudo utilizamos a administração do anestésico dissociativo cetamina, pois este age sobre o sistema glutamatérgico, sabidamente envolvido na esquizofrenia, e reproduz especialmente alterações de comportamento em roedores característicos do transtorno (Becker et al.,

2003).

A cetamina é antagonista não-competitivo dos receptores NMDA, alterando o fluxo de cátions através da membrana plasmática do neurônio (Dingledine et al, 1999). Em humanos, a cetamina tem ação por 30 minutos a 2 horas por via intramuscular e por 4 a 6 horas via oral (Quibell et al., 2011). No entanto, em modelos animais, diversas modificações na bioquímica dos neurônios podem ser vistas horas após a depuração da substância (Rezin et al. 2010), assim com o comportamento pode permanecer alterado dias após a suspensão do fármaco, se administrado cronicamente (Chatterjee et al., 2011).

A cetamina em baixas doses tem efeito neuroprotetor e antidepressivo. Apesar de o uso recreacional por humanos causar danos evidentes, além de ser altamente adictivo, é sabido que baixas doses agudas têm efeito temporário, mas significativo, na depressão em modelos animais deste transtorno (Garcia et al., 2008; 2009).

Pacientes esquizofrênicos relatam similaridade dos efeitos da cetamina com os sintomas psicóticos (Lahti et al 2007). Grande parte dos genes estatisticamente relacionados à Esquizofrenia também levam à hipofunção do receptor NMDA como sua consequência final, ao longo do neurodesenvolvimento (Li e He, 2007; Karam et al. 2010). Todos esses fatos reforçam a validade do uso da cetamina, pois esta ao bloquear o receptor NMDA de forma não-competitiva, mimetiza o fenótipo da esquizofrenia tanto no comportamento do animal quanto na bioquímica cerebral. Podemos então testar, neste modelo experimental, se determinado fator, (como a privação materna) irá “potencializar” ou “suavizar” este “fenótipo” no animal (Becker et al., 2003).

1.2.7 Esquizofrenia e Privação Materna

A privação severa de cuidados maternos (ou de outra pessoa que o substitua) causa graves consequências para o desenvolvimento humano. Estudo clássico da OMS sistematizou os estudos observacionais até então realizados, divulgando os efeitos nefastos da ausência de um relacionamento afetivo para crianças (Bowby, 1951). Em seres humanos, tenta-se investigar os efeitos da privação materna através de estudos epidemiológicos, já que estudos experimentais são, obviamente, inaceitáveis do ponto de vista ético. De fato, recentes estudos em países desenvolvidos providos de sistema universal de atendimento à saúde (proporcionando coortes de alta relevância) têm

demonstrado elevado risco atribuível na população por exposição a fatores pré-natais, maternos e obstétricos (Isohanni, 1997; Gunduz, 1999; Brown e Derkitis, 2009).

Sabe-se que a depressão materna, por si só, não é causadora de esquizofrenia, mas em adição a fatores genéticos contribui para o aumento da incidência da esquizofrenia na prole (Mäki et al., 2003; Mäki et al., 2010). Já o estilo de cuidado materno, ou a sua ausência, não tem ainda claro o seu papel na Esquizofrenia. Outro estudo de coorte na antiga Tchecoslováquia mostrou aumento da incidência de doenças psiquiátricas em geral entre filhos de mães que relataram gravidez indesejada (David, 2006).

O estresse durante a infância, separado de outros fatores, não está estabelecido como fator causal da esquizofrenia (Brown, 2011). Foi demonstrado, no entanto, a importância do ambiente familiar no prognóstico de crianças adotadas com alto risco para transtornos do espectro esquizofrênico (Tienari et al., 2004).

É possível que o estresse agudo (fig 2) e crônico possa causar alterações na bioquímica celular, as quais reforcem as alterações presentes em indivíduos com Esquizofrenia. Assim, o aumento crônico do cortisol (na infância) levaria, indiretamente, a uma alteração no sistema glutamatérgico, reforçando a cadeia de eventos que culminariam no surgimento dos sintomas psicóticos (no final da adolescência).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o efeito da privação materna em ratos Wistar submetidos à administração de cetamina na idade adulta sob parâmetros bioquímicos de estresse oxidativo, níveis de neurotrofinas e atividade dos complexos mitocondriais, enzimas do ciclo de Krebs e creatina cinase.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os níveis de NGF e BDNF em córtex pré-frontal, hipocampo e estriado de ratos adultos tratados com diferentes doses de cetamina ou salina e submetidos ou não à privação materna durante o período perinatal
- Avaliar os níveis de TBARS e proteínas carboniladas em córtex pré-frontal, hipocampo e estriado de ratos adultos tratados com diferentes doses de cetamina ou salina e submetidos ou não à privação materna durante o período perinatal
- Avaliar a atividade da creatina cinase em córtex pré-frontal, hipocampo e estriado de ratos adultos tratados com diferentes doses de cetamina ou salina e submetidos ou não à privação materna durante o período perinatal
- Avaliar a atividade da malato desidrogenase e succinato desidrogenase em córtex pré-frontal, hipocampo e estriado de ratos adultos tratados com diferentes doses de cetamina ou salina e submetidos ou não à privação materna durante o período perinatal
- Avaliar a atividade dos complexos I, II, II-III e IV da cadeia respiratória mitocondrial em córtex pré-frontal, hipocampo e estriado de ratos adultos tratados com diferentes doses de cetamina ou salina e submetidos ou não à privação materna durante o período perinatal.

3 METODOLOGIA

Os experimentos foram feitos na Universidade do Extremo Sul Catarinense, no Laboratório de Neurociências e no Laboratório de Fisiopatologia. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as recomendações internacionais para o cuidado e o uso de animais de laboratório, além das recomendações para o uso de animais da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento (SBNeC). Este projeto foi executado após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEUA) (103/2011) da Universidade do Extremo Sul Catarinense.

3.1 ANIMAIS

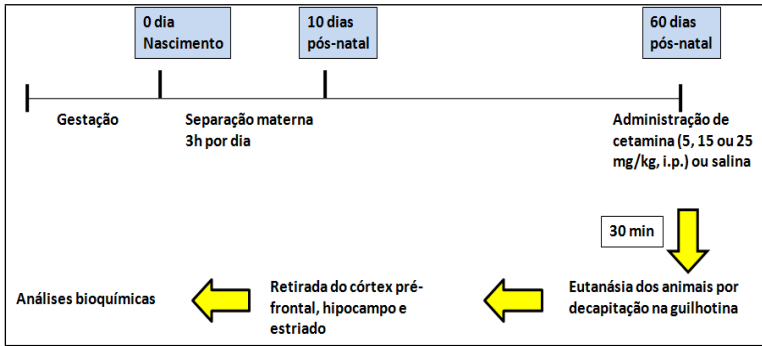
Foram utilizados ratos Wistar fêmeas e ratos Wistar machos adultos. As fêmeas foram selecionadas quanto ao ciclo estral. Após determinar o ciclo estral, cada rata foi mantida com um rato Wistar macho para acasalamento. Essas fêmeas são procedentes do biotério da UNESC (idade, 60-70-dias, peso, 200-220g) ficaram por uma semana na presença de machos para experiência sexual. No final do período de 7 dias as ratas grávidas ficaram alojadas individualmente com acesso *ad libitum* ao alimento e água. Todas as mães e filhotes foram mantidos em um ciclo claro/escuro de 12 horas (06:00 às 18:00) e temperatura de $23 \pm 1^\circ$ C. os filhotes machos foram desmamados com 21 dias e mantidos em condições ideais de laboratório até completarem 60 dias. Ao atingirem essa idade os animais foram utilizados no experimento.

3.2 PRIVAÇÃO MATERNA

O protocolo utilizado foi o de Mello et al. (2009). No primeiro dia pós-natal as ninhadas foram reduzidas a oito filhotes machos. Os filhotes permaneceram privados da mãe durante 3 horas por dia, durante os 10 primeiros dias. A privação consiste em retirar a mãe da caixa e manter os filhotes na caixa original, para ficarem na presença do odor materno. Os animais não privados permanecem imperturbáveis na gaiola original com sua mãe. As caixas em ambos os grupos só foram trocadas no 11^o dia após o período pré-natal. Os ratos sofreram o desmame apenas no 22^o dia após o período pré-natal e apenas os machos foram classificados para utilização do estudo, as

fêmeas foram doadas para outros grupos de pesquisa (Figura 7).

Figura 7- Desenho Experimental



Modelo da privação materna e administrações de cetamina ou salina em ratos.

3.3 CETAMINA

A cetamina foi administrada nas doses de 5, 15 e 25 mg/kg, preparada em solução salina no volume de 1 mL/100g, por via intraperitoneal (Becker et al., 2003). A administração da dose de 25 mg/kg é utilizada para mimetizar alguns sintomas psicóticos, tais como a hiperlocomoção e embotamento afetivo (Hunt et al., 2006). O objetivo de administrar doses baixas de cetamina é verificar se essas desencadeiam hiperlocomoção em ratos expostos à privação materna. Sabe-se que baixas doses de cetamina (5 mg/kg) não causam alteração da locomoção (Garcia et al., 2008).

3.4 DESENHO EXPERIMENTAL

Os animais foram divididos em 8 grupos experimentais: 1) grupo não-privado + salina; 2) grupo não-privado + cetamina 5mg/kg; 3) grupo não-privado + cetamina 15mg/kg; 4) grupo não-privado + cetamina 25mg/kg; 5) grupo privado + salina; 6) grupo privado + cetamina 5mg/kg; 7) grupo privado + cetamina 15mg/kg; 8) grupo privado + cetamina 25mg/kg (Tabela 1).

Tabela 1. Divisão dos grupos experimentais.

Grupos	
1) Não-privado + Salina	5) Privado + Salina
2) Não-privado + Cetamina (5mg/kg)	6) Privado + Cetamina (5 mg/kg)
3) Não-privado + Cetamina (15 mg/kg)	7) Privado + Cetamina (15 mg/kg)
4) Não-privado + Cetamina (25 mg/kg)	8) Privado + Cetamina (25 mg/kg)

Fonte: Dados da Pesquisa

Os animais ficaram condicionados em 6 por caixa, com ciclo de claro e escuro de 12 horas (06:00 às 18:00) e comida e água *ad libitum*.

3.5 DOSAGENS BIOQUÍMICAS

3.5.1 Níveis de BDNF e NGF

Níveis de BDNF e NGF no córtex pré-frontal, hipocampo e estriado foram medidos por ELISA-sanduíche, de acordo com as instruções do fabricante dos respectivos *kits* (Chemicon, EUA para o BDNF e Millipore, Canadá para o NGF). Córtex pré-frontal, hipocampo e estriado foram homogeneizados em tampão fosfato (PBS) com inibidores de protease (Sigma).

3.5.2 Formação de espécies reativas do Ácido Tiobarbitúrico

Para determinar o dano oxidativo em lipídios, foi medida a formação de espécies de ácido tiobarbitúrico (TBARS) durante uma reação em meio ácido aquecido, conforme descrito por Draper e Hadley (1990). As amostras foram misturadas com 1 ml de ácido tricloroacético 10% e 1ml de ácido tiobarbitúrico 0,67% e, em seguida, aquecidas em um banho de água fervente por 30 minutos. Equivalentes de malondialdeído (nmol/mg de proteína) foram determinados por espectrofotometria, à absorbância a 535 nm.

3.5.3 Carbonilação de Proteínas

O dano oxidativo às proteínas foi avaliado pela determinação do teor de grupos carbonil baseados na reação com dinitrofenilidrazina (DNPH), como descrito por Levine et al. (1990). As proteínas foram precipitadas pela adição de ácido tricloroacético a 20%, centrifugadas com força centrífuga de 8000g e então redissolvidas em DNPH. A

absorbância foi monitorada por espectrofotometria a 370 nm.

3.5.4 Atividade da creatina cinase

As estruturas cerebrais foram homogeneizadas em solução salina (1:10, p/v), o homogeneizado será centrifugado a 800 x g por 10 minutos e o sobrenadante utilizado para determinação da atividade da creatina cinase total. As frações mitocondriais são separadas por centrifugação e dosadas da mesma forma. O meio de incubação é composto por fosfocreatina, ADP e glutatona reduzida. A formação de creatina é utilizada para medir a atividade enzimática (Hughes, 1962).

3.5.5 Atividade da malato desidrogenase

A atividade da malato desidrogenase foi realizada de acordo com Kitto (1969). Alíquotas de 20 ug de proteínas foram transferidas para o meio contendo 10 mM rotenona, 0,2% Triton X-100, 0,15 mM NADH e 100 mM de tampão fosfato de potássio, pH 7,4 a 37°C. A reação foi iniciada por adição de 0,33 mM de oxaloacetato.

3.5.6 Atividade da succinato desidrogenase

A atividade da Succinato desidrogenase foi avaliada de acordo com Fischer et al. (1985). O tampão consiste em 40 mM de fosfato de potássio, pH 7,4, 16 mM succinato e 8 uM 2,6-di-cloro-indofenol (2,6-DCIP). Este tampão foi pré-incubado com 40–80 µg do homogeneizado de proteínas a 30°C por 20 min. Subsequentemente, foi adicionado a reação 4 mM de azida sódica, 7 uM de rotenona e 40 uM de 2,6-DCIP e a reação foi inicializada por adição de 1 mM metassulfato de fenazina e monitorada por 5 minutos.

3.5.7 Atividade dos Complexos da Cadeia Mitocondrial

A avaliação da atividade dos Complexos I e III realizou-se da seguinte maneira: as estruturas cerebrais foram homogeneizadas (1:10, p/v) em tampão SETH, pH 7,4 (sacarose 250 mM, EDTA 2 mM, Trizma Base 10 mM e heparina 50UI/mL). O homogeneizado foi centrifugado a 800 g por 10 minutos e o sobrenadante armazenado a –70°C para determinação da atividade enzimática. A atividade enzimática foi medida pelo método descrito por Schapira e colaboradores (1990), no qual a redução do citocromo c oxidado na presença de NADH (em

espectrofotometria 550 nm) na ausência e presença de rotenona é avaliada. As atividades enzimáticas foram medidas pelo método descrito por Fischer et al.(1985) nos quais a diminuição da absorbância do 2,6-DCIP em 600 nm foi usada para o cálculo da atividade do complexo II. Para o cálculo da SDH foi utilizado o mesmo sistema na presença de metassulfato de fenazina. A atividade do complexo IV foi determinada de acordo com Rustin et al.(1994), e calculada pela diminuição da absorbância causada pela oxidação do citocromo c reduzido, medido em 550 nm.

3.5.8 Determinação de proteínas

As proteínas foram medidas usando o método descrito por Lowry et al. (1951) usando albumina bovina como padrão.

3.6 ESTATÍSTICA

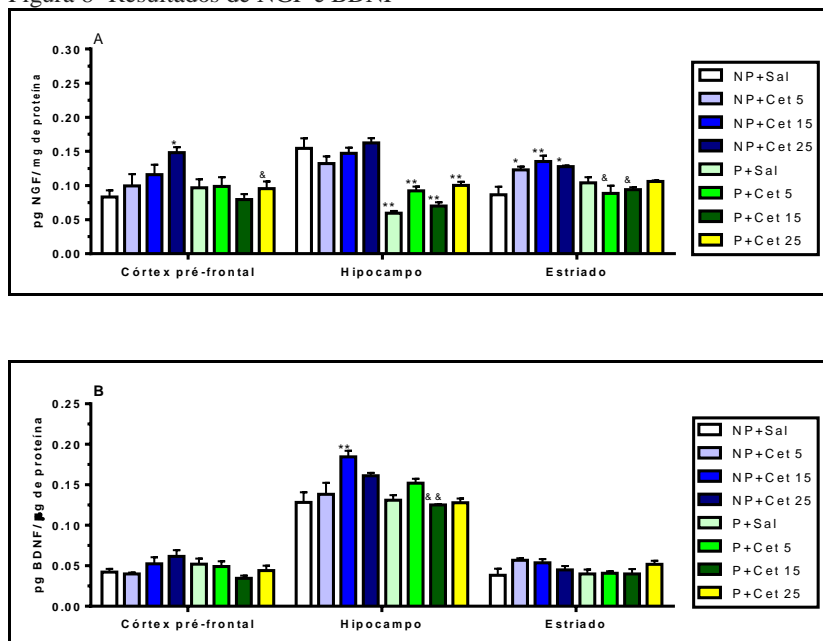
Todos os resultados foram apresentados como a média \pm EPM (erro padrão da média). A comparação entre os diferentes grupos experimentais foram realizadas através da análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguido pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls, quando apropriado.

4. RESULTADOS

4.1 NÍVEIS DE NGF E BDNF

Os resultados apresentados na figura 8 mostram os níveis de NGF (painel 8A) e BDNF (painel 8B) no córtex pré-frontal, hipocampo e estriado de animais privados ou não maternamente e submetidos à administração de cetamina (5, 15 and 25 mg/kg) ou salina. No resultados de NGF, ANOVA de duas vias revelou diferenças significativas no córtex pré-frontal para o grupo privado [$F(1,32)=4,90$, $p<0,05$] e para a interação entre os grupos privado vs. cetamina [$F(3,32)=3,19$, $p<0,05$], mas não para o grupo cetamina [$F(3, 32)=2,56$, $p=0,07$]. No hipocampo, ANOVA de duas vias revelou um significativo efeito principal do grupo privado [$F(1,28)=149,49$, $p<0,01$], grupo cetamina [$F(3,28)=4,09$, $p<0,05$] e da interação entre os grupos privado vs. grupo cetamina [$F(3,28)=4,09$, $p<0,05$]. No estriado, a ANOVA de duas vias revelou um efeito principal do grupo privado [$F(1,26)=12,94$, $p<0,01$], grupo cetamina [$F(3,26)=3,12$, $p<0,05$] e da interação entre os grupos privado vs. grupo cetamina [$F(3,28)=5,69$, $p<0,01$]. Para os resultados dos níveis de BDNF ANOVA de duas vias revelou diferenças significativas no hipocampo o para o grupo privado [$F(1,27)=9,95$, $p<0,01$] e para a interação entre os grupos privado vs. cetamina [$F(3,27)=7,81$, $p<0,01$], mas não para o grupo cetamina [$F(3, 27)=2,92$, $p=0,05$]. No córtex pré-frontal, ANOVA de duas vias apresentou efeito significativo somente para a interação entre os grupos privado vs. grupo cetamina [$F(3,32)=3,50$, $p<0,05$], porém o *post-hoc* de Newman-Keuls não mostrou diferenças significativas entre os grupos experimentais. No estriado não houve alterações nos níveis de BDNF.

Figura 8- Resultados de NGF e BDNF



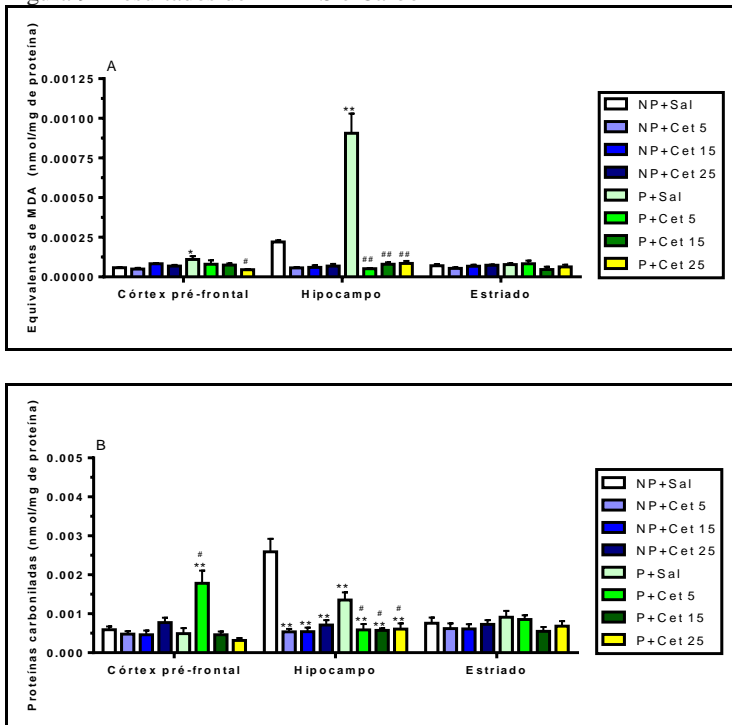
Efeito da privação materna em animais submetidos à administração de diferentes doses de cetamina (5, 15 e 25mg/kg, i.p.) nos níveis de NGF (painel A) e BDNF (painel B). Os valores estão representados como a média \pm EPM (erro padrão da média). Foi realizado para a análise estatística ANOVA de uma via seguido pelo teste post-hoc de Newman-Keuls. ** $p < 0,01$ ou * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo não-privado + salina. && $p < 0,01$ ou & $p < 0,05$ quando comparado ao mesmo grupo, porém não-privado. NP- não privado; Cet- cetamina; P- privado.

4.2 NÍVEIS DE TBARS E PROTEÍNAS CARBONILADAS

Os resultados ilustrados na figura 9 mostram os níveis de TBARS (painel 9A) e proteínas carboniladas (painel 9B) no córtex pré-frontal, hipocampo e estriado de animais privados ou não maternamente e submetidos à administração de cetamina (5, 15 and 25 mg/kg) ou salina. ANOVA de duas vias revelou diferenças significativas nos níveis de TBARS no córtex pré-frontal {grupo privado [F(1,28)=2,27, $p=0,14$], grupo cetamina [F(3, 28)=2,20, $p=0,11$] e interação entre os grupos privado vs. cetamina [F(3,28)=4,11, $p < 0,05$]} e hipocampo {grupo privado [F(1,29)=26,35, $p < 0,01$], grupo

cetamina [F(3, 29)=53,52, p<0,01] e interação entre os grupos privado vs. cetamina [F(3,29)=24,83, p<0,01]], mas não no estriado. Para os resultados dos níveis de proteínas carboniladas ANOVA de duas vias revelou um significativo efeito principal do grupo cetamina [F(3,29)=8,51, p<0,01] e da interação entre os grupos privado vs. grupo cetamina [F3,29)=12,96, p<0,01], mas não para o grupo privado [F(1,29)=2,30, p=0,10]. No hipocampo, a ANOVA de duas vias revelou um efeito principal do grupo privado [F(1,31)=6,22, p<0,05], grupo cetamina [F(3,39)=32,14, p<0,01] e da interação entre os grupos privado vs. grupo cetamina [F3,29)=6,44, p<0,01]. No estriado não houve alterações nos níveis de proteínas carboniladas.

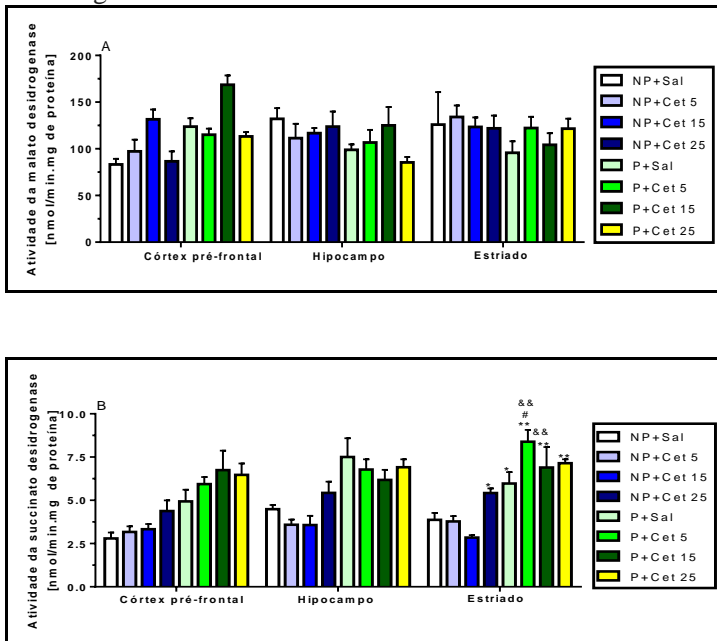
Figura 9- Resultados de TBARS e Carbonil



Efeito da privação materna em animais submetidos à administração de diferentes doses de cetamina (5, 15 e 25mg/kg, i.p.) nos níveis de TBARS (painel A) e proteínas carboniladas (painel B). Os valores estão representados como a média ± EPM (erro padrão da média). Foi realizado para a análise estatística ANOVA de uma via seguido pelo teste post-hoc de Newman-Keuls.

maternamente e submetidos à administração de cetamina (5, 15 and 25 mg/kg) ou salina. Para os dados da atividade da malato desidrogenase a ANOVA de duas vias não revelou diferenças significativas nas três estruturas cerebrais estudadas. Para os resultados da atividade da enzima succinato desidrogenase a ANOVA de duas vias mostrou diferenças significativas somente no estriado para o grupo privado [F(1,37)=73,01, p<0,01], grupo cetamina [F(3, 37)=4,18, p<0,05] e interação entre os grupos privado vs. cetamina [F(3,37)=3,94, p<0,05], mas não no córtex pré-frontal e hipocampo.

Figura 11- Resultados da Malato Desidrogenase e da Succinato Desidrogenase



Efeito da privação materna em animais submetidos à administração de diferentes doses de cetamina (5, 15 e 25mg/kg, i.p.) na atividade da malato desidrogenase (painel A) e succinato desidrogenase (painel B). Os valores estão representados como a média ± EPM (erro padrão da média). Foi realizado para a análise estatística ANOVA de uma via seguido pelo teste post-hoc de Newman-Keuls. ** p<0,01 ou * p<0,05 quando comparado ao grupo não-privado + salina. # p<0,05 quando comparado ao privado + salina. && p<0,01 quando comparado ao mesmo grupo, porém não-privado. NP- não privado; Cet- cetamina; P- privado.

4.5 ATIVIDADE DA DOS COMPLEXOS I, II, III E IV DA CADEIA RESPIRATÓRIA MITOCONDRIAL

Os resultados apresentados na figura 12 mostram a atividade do complexo I (painel 12A), complexo II (painel 12B), complexo II-III (painel 12C) e complexo IV (painel 12D) no córtex pré-frontal, hipocampo e estriado de animais privados ou não maternamente e submetidos à administração de cetamina (5, 15 and 25 mg/kg) ou salina. Para os dados da atividade do complexo I a ANOVA de duas vias não revelou diferenças significativas nas três estruturas cerebrais estudadas. Para os resultados da atividade do complexo II a ANOVA de duas vias mostrou diferenças significativas no córtex pré-frontal {grupo privado [F(1,33)=22,13, p<0,01], grupo cetamina [F(3, 33)=15,41, p<0,01] e interação entre os grupos privado vs. cetamina [F(3,33)=2,97, p<0,01]} e estriado {grupo privado [F(1,33)=26,65, p<0,01], grupo cetamina [F(3, 33)=2,69, p=0,06] e interação entre os grupos privado vs. cetamina [F(3,33)=3,71, p<0,05]}, mas não no hipocampo. Adicionalmente a ANOVA de duas vias revelou diferenças significativas na atividade do complexo II-III no córtex pré-frontal {grupo privado [F(1,33)=40,69, p<0,01], grupo cetamina [F(3, 33)=0,71, p=0,71] e interação entre os grupos privado vs. cetamina [F(3,33)=6,65, p<0,01]}, hipocampo {grupo privado [F(1,35)=55,29, p<0,01], grupo cetamina [F(3, 35)=4,63, p<0,01] e interação entre os grupos privado vs. cetamina [F(3,35)=7,24, p<0,01]} e estriado {grupo privado [F(1,33)=66,60, p<0,01], grupo cetamina [F(3, 33)=3,69, p<0,05] e interação entre os grupos privado vs. cetamina [F(3,33)=3,75, p<0,05]}. Finalmente, a ANOVA de duas vias revelou diferenças significativas na atividade do complexo IV no córtex pré-frontal {grupo privado [F(1,32)=18,05, p<0,01], grupo cetamina [F(3, 32)=1,43, p=0,25] e interação entre os grupos privado vs. cetamina [F(3,32)=3,33, p<0,05]}, hipocampo {grupo privado [F(1,34)=6,59, p<0,05], grupo cetamina [F(3, 34)=1,12, p=0,35] e interação entre os grupos privado vs. cetamina [F(3,34)=14, 22, p<0,01]} e estriado {grupo privado [F(1,34)=44,68, p<0,01], grupo cetamina [F(3, 34)=2,35, p=0,09] e interação entre os grupos privado vs. cetamina [F(3,34)=8,14, p<0,01]}.

Figura 12- Resultados dos Complexos da Cadeia Mitocondrial

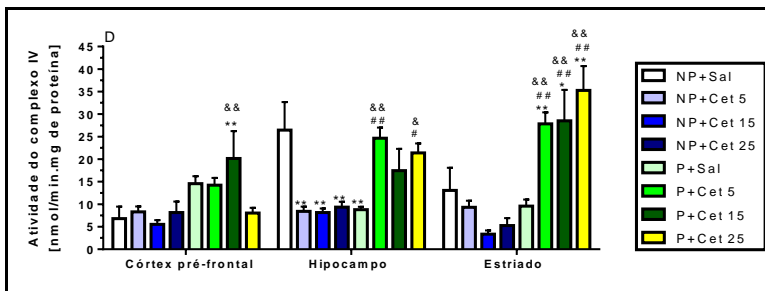
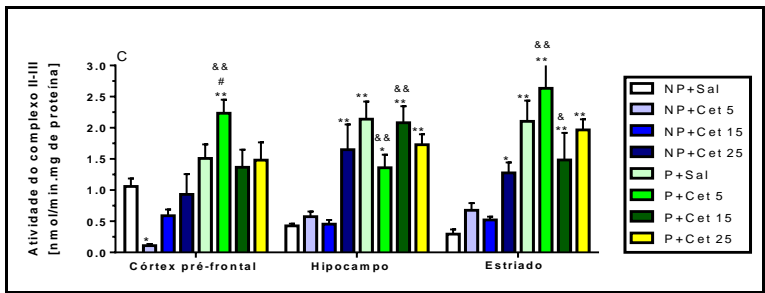
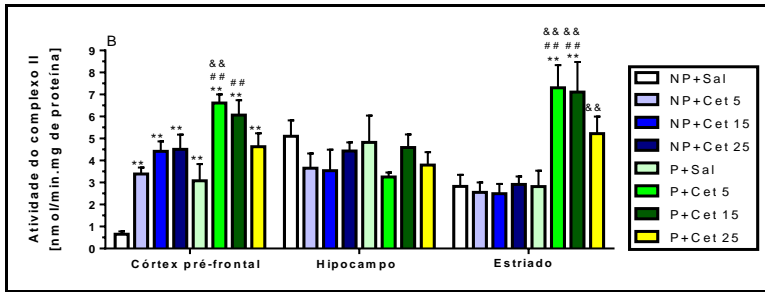
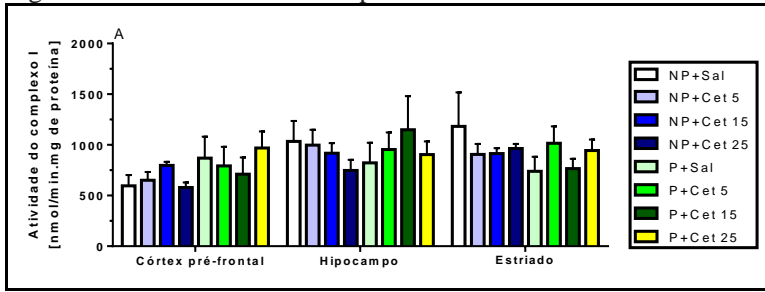


Figura 12. Efeito da privação materna em animais submetidos à administração de diferentes doses de cetamina (5, 15 e 25mg/kg, i.p.) na atividade do complexo I (painel A), complexo II (painel B), complexo II-III (painel C) e complexo IV (painel D). Os valores estão representados como a média \pm EPM (erro padrão da média). Foi realizado para a análise estatística ANOVA de uma via seguido pelo teste post-hoc de Newman-Keuls. ** $p < 0,01$ ou * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo não-privado + salina. ## $p < 0,05$ ou # $p < 0,05$ quando comparado ao privado + salina. && $p < 0,01$ ou & $p < 0,05$ quando comparado ao mesmo grupo, porém não-privado. NP- não privado; Cet- cetamina; P- privado.

5 DISCUSSÃO

O presente trabalho avaliou o efeito da administração de cetamina (5, 15 e 25 mg/kg) em animais privados materno materno sobre parâmetros bioquímicos de neurotrofinas, dano oxidativo e metabolismo energético no córtex pré-frontal, hipocampo e estriado. Observou-se que a cetamina associada à privação materna reduziu os níveis de NGF, mas não de BDNF no hipocampo. A privação materna *per se* induziu aumento de TBARS no córtex pré-frontal e hipocampo. Privação materna *per se* e em associação à cetamina (5, 15 ou 25 mg/kg) induziu diminuição das proteínas carboniladas no hipocampo. Além disso, a privação materna *per se* ou associada à cetamina provocou aumento da atividade dos complexos mitocondriais II, II- III e IV e alterações das enzimas envolvidas no ciclo de Krebs (succinato desidrogenase) e creatina cinase em diferentes regiões cerebrais.

De acordo com a hipótese neurodesenvolvimental da esquizofrenia (fig 3), uma interação entre distúrbio neurodesenvolvimental precoce e maturação do cérebro periadolescente pode ser o gatilho para desencadear o comportamento psicótico (fig 1) que tipicamente aparece durante a adolescência e início da vida adulta (Meyer e Feldon, 2010). Estudos mostram que experiências adversas na infância influenciam profundamente o desenvolvimento do SNC, endócrino e sistema imune, consequentemente afetando o comportamento durante a vida adulta e contribuindo para o desenvolvimento de transtornos psiquiátricos como a esquizofrenia (Morgan et al., 2007). Portanto, neste trabalho foram analisadas as alterações bioquímicas de animais privados materno materno e submetidos a diferentes doses de cetamina (5, 15 ou 25 mg/kg). É bem documentado que a dose de 25 mg/kg de cetamina, um anestésico dissociativo antagonista de receptores NMDA, induz comportamento tipo-esquizofrenia em roedores (De Oliveira et al., 2011) e humanos (Becker et al., 2003), caracterizando um modelo animal de esquizofrenia quando este fármaco é administrado em roedores (De Oliveira et al., 2011).

Considerando que NGF e BDNF representam um grupo de proteínas diméricas que afetam o crescimento do SNC de todas as espécies de vertebrados e, portanto estas neurotrofinas têm um papel crucial no neurodesenvolvimento, são plausíveis candidatos envolvidos na patofisiologia da esquizofrenia. Portanto, neste trabalho foi avaliado o nível de neurotrofinas (NGF e BDNF) em animais injetados com

cetamina (5, 15 ou 25 mg/kg) e submetidos à privação materna. Os resultados indicam que privação materna sozinha ou associada a injeções de cetamina (5, 15 ou 25 mg/kg) indicaram redução dos níveis de NGF no hipocampo de ratos. Cetamina 5, 15 ou 25 mg/kg *per se* não alterou os níveis de NGF nesta estrutura cerebral. Os resultados dos animais privados matematicamente corroboram o estudo de Abelaira et al. (2012) o qual mostra que a privação materna em ratos induziu redução dos níveis de NGF no hipocampo. Os resultados do presente estudo sugerem que a privação materna *per se* ou associada à cetamina 5, 15 ou 25 mg/kg pode mimetizar alterações bioquímicas encontradas em pacientes esquizofrênicos, uma vez que Xiong et al. (2011) mostrou que pacientes esquizofrênicos apresentam baixos níveis séricos de NGF. Baseado neste fato, mais estudos devem ser realizados para clarear o papel do NGF no modelo animal de esquizofrenia induzido por cetamina.

Além disso, foi observado que no córtex prefrontal, cetamina (25 mg/kg) *per se* induziu aumento dos níveis de NGF e esta mesma dose de cetamina associada com privação materna não induziu este aumento. Estes dados sugerem que a privação materna pode influenciar na redução dos níveis de NGF em animais submetidos à injeção de 25 mg/kg de cetamina. A dose aguda ou subcrônica (7 dias) de cetamina 25 mg/kg é utilizada para induzir o modelo animal de esquizofrenia (aumento da atividade locomotora, estereotipia e déficit na interação social) em ratos (de Oliveira et al., 2011). Um estudo mostrou que a cetamina 30 mg/kg administrada durante 5 dias em ratos não induziu alterações nos níveis de NGF no córtex pré-frontal (Becker et al., 2008).

O presente estudo também avaliou no estriado o efeito da privação materna e a administração de diferentes doses de cetamina (5, 15 ou 25 mg/kg) em ratos na idade adulta nos níveis de NGF. Foi observado que as três doses de cetamina *per se* induziram aumento dos níveis de NGF no estriado. Já está bem descrito que a cetamina na dose aguda de 15 mg/kg apresenta efeito antidepressivo no teste do nado forçado em ratos (Garcia et al., 2008). Portanto, pode-se esperar um aumento de NGF nesta dose aguda. Porém, Becker et al. (2008) mostrou que cetamina 30 mg/kg administrada em ratos durante 5 dias induziu redução dos níveis de NGF no estriado. O aumento de NGF encontrado no nosso estudo pode ser um evento anterior à sua redução.

Com relação aos resultados dos níveis de BDNF, a privação materna sozinha ou em associação com cetamina (5, 15 ou 25

mg/kg) não induziu alteração em nenhuma das três estruturas estudadas. Somente a administração *per se* de cetamina 15 mg/kg induziu aumento dos níveis de BDNF no hipocampo. Este efeito foi abolido nos animais privados maternalmente. Sabe-se que a dose de 15 mg/kg de cetamina apresenta efeito antidepressivo (Garcia et al., 2008) o que pode justificar o aumento de BDNF, já que esta neurotrofina é importante para a coordenação da migração e conectividade dos neurônios corticais (Autry e Monteggia, 2012).

A privação materna (ou outro tipos de estresse) pode causar graus muito variáveis de dano conforme o período da vida em que é aplicado (Roceri et al., 2004), a duração (Jurcovicova e Dobrakovova, 1998) e a carga genética (Ellenbroek e Cools, 2000). Determinados protocolos experimentais, mais severos, foram utilizados para induzir alterações semelhantes aos sintomas “negativos” da esquizofrenia em animais (Takase et al., 2012). O presente protocolo é menos severo (Mello et al., 2009) e tenta mimetizar situações em que não se sabe se a privação materna (em sendo menos severa) teve papel na fisiopatologia do transtorno, neste caso, na Esquizofrenia.

Podemos especular que a sinalização do cálcio, do cortisol e as alterações epigenéticas (figs 2 e 4) sejam as vias comuns entre a resposta ao estresse crônico e a atividade das neurotrofinas, presentes tanto na Esquizofrenia quanto em outros transtornos mentais (Mifsud et al., 2011; Numakawa et al., 2011).

O estresse oxidativo pode ser explicado por geração de ERO, o qual pode diminuir as defesas antioxidantes do cérebro levando ao dano oxidativo. A disfunção mitocondrial e acúmulo de proteínas oxidadas podem causar dano ao DNA e ácidos graxos de membrana, os quais prejudicam a sinalização lipídica, aumentando dano a lipídios (Ramalingam e Kim, 2012). Levando isso em consideração, o presente estudo analisou os níveis de TBARS em ratos privados maternalmente e submetidos à administração de diferentes doses de cetamina (5, 15 ou 25 mg/kg) na idade adulta. Os resultados mostraram que a privação materna sozinha induziu aumento nos níveis de TBARS, indicativo de peroxidação lipídica, no córtex pré-frontal e hipocampo, mas não no estriado. Estes dados corroboram estudo de Uysal et al. (2005) o qual mostra que ratos privados maternalmente apresentam aumento dos níveis de TBARS no córtex pré-frontal, hipocampo e estriado. Estes dados mostram que privação materna pode estar associada com dano oxidativo, efeito observado em muitos pacientes psiquiátricos como, por exemplo, em pacientes esquizofrênicos (Kunz et al., 2008; Dietrich- Muszalska e Kontek,

2010). Adicionalmente, os resultados do presente estudo mostram que o aumento nos níveis de TBARS induzido por privação materna foi abolido no córtex pré-frontal pela administração de cetamina na dose de 25 mg/kg e no hipocampo pelas doses de 5, 15 ou 25 mg/kg de cetamina. Considerando que a dose aguda de cetamina (15 mg/kg) apresenta pronunciado efeito antidepressivo no teste do nado forçado em ratos (Garcia et al., 2008), pode-se justificar o efeito na redução da peroxidação lipídica. A dose de 5 e 25 mg/kg de cetamina perante a um insulto pode agir como protetora da peroxidação lipídica, sugerindo um efeito dual e região-específica da cetamina em doses agudas.

A carbonilação de proteínas também pode ser um importante marcador para dano oxidativo e fator causal na injúria oxidativa (Cao e Cutler, 1995). Portanto, com o intuito de consolidar o estudo em relação ao dano oxidativo, o presente estudo avaliou também os níveis de proteínas carboniladas em animais privados matematicamente e submetidos à administração de cetamina (5, 15 ou 25 mg/kg) na idade adulta. Os resultados mostraram alterações principalmente no hipocampo no qual cetamina (5, 15 ou 25 mg/kg), privação materna *per se* ou a associação de cetamina com privação materna reduziram os níveis de proteínas carboniladas. Ghedim et al. (2012) mostrou que cetamina 25 mg/kg administrada em ratos durante 7 dias, mas não 14 dias induziu aumento de proteínas carboniladas. Por outro lado, Garcia et al. (2008) mostrou que doses agudas de cetamina (10 e 15 mg/kg) apresentam efeito antidepressivo. Portanto, é possível sugerir que a redução do dano protéico seja em função de um efeito protetor da cetamina aguda no hipocampo.

A creatina cinase está envolvida na estocagem de fosfatos de alta energia produzidos pela mitocôndria e, portanto é responsável pela homeostase energética normal uma vez que integra muitas funções cruciais para o organismo como controle temporário de energia, capacidade metabólica, transferência de energia e controle metabólico (Khuchua et al., 1998; Schlattner e Wallimann, 2000; Pilla et al., 2003). Esta enzima é essencial na manutenção do potencial de membrana, neurotransmissão e sinalização intracelular (Wyss e Kaddurah-Daouk, 2000). Dada a importância desta enzima, no presente trabalho foi avaliada a sua atividade. Os resultados mostram que somente no hipocampo cetamina 25 mg/kg, privação materna, bem como cetamina (5, 15 e 25 mg/kg) associada à privação materna induziram redução da atividade da creatina cinase. Estes achados corroboram estudos que mostram que há anormalidades na enzima creatina cinase no cérebro de pacientes esquizofrênicos

(Burbaeva et al., 2003). Burbaeva et al. (2003) que verificou uma diminuição desta enzima em tecido cerebral *post mortem* de pacientes esquizofrênicos. Além disso, o presente trabalho verificou que a administração de cetamina (5 e 15 mg/kg) em ratos privados maternalmente induziu maior redução da atividade desta enzima quando comparado somente a privação materna ou às doses de cetamina (5 e 15 mg/kg) sem privação materna, indicando que a privação materna suscetibilizou a redução da atividade da enzima creatina cinase, sugerindo que essa diminuição esteja associada à disfunção energética cerebral presente na esquizofrenia. Vale ressaltar que os dados do presente estudo também mostram que cetamina 25 mg/kg induziu redução da atividade da enzima creatina cinase

O presente trabalho também avaliou as enzimas envolvidas succinato desidrogenase e malato desidrogenase, duas enzimas do ciclo de Krebs. Alterações no ciclo de Krebs, avaliado por medida da atividade das enzimas envolvidas nesta rota metabólica, pode alterar profundamente a taxa do metabolismo cerebral e a produção de radicais livres (Lyubarev e Kurganov, 1989; Vélot et al., 1997). O ciclo de Krebs é responsável por converter a acetil- Coenzima A a CO₂, resultando e uma grande produção de equivalentes redutores (ex. NADH) para a cadeia transportadora de elétrons e subsequentemente produção de ATP (Lyubarev e Kurganov, 1989; Vélot et al., 1997). Portanto avaliamos, no presente trabalho duas enzimas envolvidas no ciclo de Krebs: succinato desidrogenase e malato desidrogenase. Os resultados indicam que a cetamina (5,15 e 25 mg/kg), privação materna ou a associação de diferentes doses de cetamina com a privação materna não induziu alteração na enzima malato desidrogenase. Já a atividade da succinato desidrogenase foi encontrada aumentada no estriado de animais administrados com cetamina (25 mg/kg), animais somente privados e animais privados e administrados com cetamina (5, 15 e 25 mg/kg) na idade adulta. Um estudo clínico realizado por Bubber et al. (2012) mostrou que pacientes esquizofrênicos apresentam níveis aumentados de malato desidrogenase e succinato desidrogenase no cérebro, corroborando os dados do presente estudo, com relação à succinato desidrogenase no estriado. De acordo com os resultados do presente estudo é possível observar que a privação materna associada à cetamina 5 e 15 mg/kg induziu aumento da atividade da succinato desidrogenase no estriado quando comparadas aos resultados destas mesmas doses de cetamina, porém em animais não privados. Portanto, a privação materna

suscetibilizou os animais às alterações bioquímicas quando da administração de cetamina 5 e 15 mg/kg no estriado. Neste trabalho o aumento da atividade da succinato desidrogenase pode indicar geração de radicais livres e espécies reativas de oxigênio, induzindo estresse oxidativo, confirmado por aumento nos níveis de TBARS principalmente no grupo privação materna sozinha.

Finalmente neste trabalho foram avaliados os complexos enzimáticos I, II, III e IV da cadeia transportadora de elétrons. No presente estudo, foi observado alterações na atividade dos complexos II, III e IV da cadeia respiratória mitocondrial, mas não na atividade do complexo I.

Cetamina (5, 15 e 25 mg/kg), privação materna e privação materna associada com cetamina (5, 15 e 25 mg/kg) induziram aumento da atividade do complexo II mitocondrial no córtex pré-frontal. Já no estriado privação materna associada à cetamina (5, 15 e 25 mg/kg) induziu aumento da atividade do complexo II. No hipocampo e estriado de animais tratados com cetamina 25 mg/kg sozinha, somente privados materno ou privados materno e tratados com cetamina (5, 15 ou 25 mg/kg) houve aumento da atividade do complexo III. Cetamina 5 mg/kg induziu redução da atividade do complexo III no córtex pré-frontal, porém esta mesma dose em animais privados materno induziu aumento na atividade deste complexo.

A atividade do complexo IV foi aumentada no estriado em animais submetidos à privação materna e à administração de cetamina (5, 15 e 25 mg/kg), sendo esta estrutura envolvida diretamente na fisiopatologia da esquizofrenia (fig 1). A atividade do complexo IV nesta estrutura foi aumentada pela associação (e apenas com a associação) da cetamina com privação materna, em todas as doses utilizadas. Este resultado sugere que os animais submetidos à privação materna foram sensibilizados ao modelo animal de esquizofrenia com cetamina. Um possível mecanismo para esta sensibilização é a interação da via do cortisol com as cascatas de sinalização do cálcio, cuja concentração na célula pode ser modificada pelas mitocôndrias e pelo receptor/ canal iônico tipo NMDA (fig 2) (Mifsud et al., 2011).

No hipocampo, cetamina (5, 10 ou 25 mg/kg) sozinha ou privação materna sozinha induziram redução da atividade do complexo IV, porém cetamina (5 e 25 mg/kg), mas não cetamina 15 mg/kg, associadas à privação materna induziram aumento da atividade deste complexo. No córtex pré-frontal, cetamina 15 mg/kg

associada à privação materna induziu aumento da atividade do complexo IV. É válido ressaltar que cetamina 15 mg/kg aguda apresenta efeito antidepressivo no teste do nado forçado em ratos (Garcia et al., 2008), em função disso, no hipocampo, esta dose associada à privação materna não alterou a atividade do complexo IV. Rezin et al. (2009) mostrou que a dose de 15 mg/kg não apresenta alterações das atividades dos complexos mitocondriais, o que corrobora a maioria dos resultados do presente estudo. Porém, inexistem estudos relacionando as doses de cetamina 5 e 25 mg/kg aguda e privação materna com os complexos da cadeia respiratória mitocondrial.

Estudos mostram mudanças na atividade dos complexos mitocondriais I e I-III (Maurer e Moller, 1997), complexo IV (Cavelier et al., 1995) e complexo II (Prince et al., 1997) em cérebro *post mortem* de pacientes esquizofrênicos. Estas alterações mitocondriais, na esquizofrenia, podem ser causadas por reações celulares que resultam de hipóxia perinatal ou disfunção primária da mitocôndria em pacientes esquizofrênicos (Prabakaran et al., 2004).

6 CONCLUSÃO

Juntos os resultados do presente trabalho indicam que privação materna e/ou cetamina (5, 15 e 15 mg/kg) podem induzir alterações nos níveis de neurotrofinas (NGF e BDNF), dano oxidativo (TBARS e proteínas carboniladas), alterações de enzimas importantes no metabolismo energético (creatina cinase e a succinato desidrogenase) e dos complexos II, II- III e IV da cadeia respiratória mitocondrial.

Os resultados corroboram estudos anteriores mostrando que os efeitos da cetamina no Sistema Nervoso Central variam conforme a dose, podendo ter efeito neuroprotetor (revertendo os efeitos da privação materna) ou efeitos deletérios para o metabolismo dos neurônios. Alguns destes resultados, ainda, sugerem que a privação materna sensibilizou os animais para os efeitos da cetamina, nas doses utilizadas.

Este trabalho contribui para elucidar o papel da privação materna (no protocolo utilizado) e da cetamina (5, 15 e 15 mg/kg) em futuros estudos em animais sobre esquizofrenia.

REFERÊNCIAS

Abelaira HM, Réus GZ, Ribeiro KF, Zappellini G, Cipriano AL, Scaini G, Streck EL, Quevedo J. Lamotrigine treatment reverses depressive-like behavior and alters BDNF levels in the brains of maternally deprived adult rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 2012; 101(3):348- 53.

Alex KD, Yavanian GJ, Mcfarlane HG, Pluto CP, Pehek EA. Modulation of dopamine release by striatal 5-HT_{2C} receptors. *Synapse.* 2005; 55 (4): 242-51.

American Psychiatry Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders. 4th Ed. 1994. Washington DC: American Psychiatric Association.

Autry AE, Monteggia LM. Brain-derived neurotrophic factor and neuropsychiatric disorders. *Pharmacol Rev.* 2012; 64(2): 238-58.

Beatty PA, Beatty WW, Bowman R E, Gilchrist JC. The effects of ACTH, adrenalectomy and dexamethasone on the acquisition of an avoidance response in rats. *Physiol Behav.* 1970; 5: 939-44.

Becker A, Grecksch G, Schwegler H, Roskoden T. Expression of mRNA of neurotrophic factors and their receptors are significantly altered after subchronic ketamine treatment. *Med Chem.* 2008; 4(3): 256-63.

Becker A, Peters B, Schroeder H, Mann T, Huether G, Grecksch G. Ketamine-induced changes in rat behaviour: a possible animal model of schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2003; 27(4): 687-700.

Bekinschtein P, Cammarota M, Igaz LM, Bevilacqua LRM, Izquierdo I, Medina JH. Persistence of long-term memory storage requires a late protein synthesis- and bdnf- dependent phase in the hippocampus. *Neuron.* 53 (2): 261-77.

Ben-Shachar D, Laifenfeld D. Mitochondria, synaptic plasticity, and schizophrenia. *Int Rev Neurobiol.* 2004; 59: 273-96.

Bitanhirwe BKY, Woo TUW. Oxidative stress in schizophrenia: an integrated approach. *Neurosci Biobehav Rev.* 2011; 35:(3) 878-93.

Boutwell BB, Beaver KM. Maternal cigarette smoking during pregnancy and offspring externalizing behavioral problems: a propensity score matching analysis. *Int J Environ Res Public Health.* 2010; 7:146-63.

Bowby J. Maternal care and mental health. *Bull World Health*

Organ. 1951;3 (3) 355-533. Brown A S, Derkitis EJ. Prenatal infection as a risk factor for schizophrenia. *Am J Psychiatry*.2009; 167:261-80.

Brown AS. The environment and susceptibility do schizophrenia. *Prog Neurobiol*. 2011; 93(1):23-58.

Bubber P, Hartounian V, Gibson GE, Blass JP. Abnormalities in the tricarboxylic acid (TCA) cycle in the brains of schizophrenia patients. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2011; 21(3): 254- 60.

Burbaeva GSh, Boksha IS, Sudakov SA, Miasoedov SN, Savushkina OK, Tereshkina EB, Starodubtseva LI, Turishcheva MS, Vorob'eva EA. The complex neurochemical assessment of brain proteins in mentally healthy subjects and schizophrenic patients. *Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova*. 2008; 108(2):44-50.

Cannon M, Jones PB, Murray RM. Obstetric complications and schizophrenia: historical and meta-analytic review. *Am J Psychiat*. 2002; 159:1080-92.

Canuso CM, Pandina G. Gender and schizophrenia. *Psychopharmacol Bull*. 2007; 40(4):178- 90.

Cao G, Cutler RG. Protein oxidation and aging. I. Difficulties in measuring reactive protein carbonyls in tissues using 2,4-dinitrophenylhydrazine. *Arch Biochem Biophys*. 1995; 320: 106-14.

Carlsson A, Waters N, Holm-water S, Tedroff J, Nilsson M, Carlsson ML. Interactions Between Monoamines, Glutamate, and GABA in Schizophrenia: New Evidence. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2001; 41, 237-60.

Carter CJ. Schizophrenia susceptibility genes converge on interlinked pathways related to glutamatergic transmission and long-term potentiation, oxidative stress and oligodendrocyte viability. *Schizophr Res* . 2006; 86(1–3):. 1-14.

Cavelier L, Jazin E, Eriksson I, Prince J, Bave U, Orelund L, Gyllensten U. Decreased cytochrome c oxidase activity and lack of age related accumulation of mtDNA in brain of schizophrenics. *Genomics*. 1995; 29:217-28.

Chao MV. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat Review Neurosc*. 2003; 4: 299-309.

Chatterjee M, Ganguly S, Srivastava M, Palit G. Effect of 'chronic' versus 'acute' ketamine administration and its 'withdrawal' effect on behavioural alterations in mice: implications for experimental psychosis. *Behav Brain Res*. 2011; 216(1):247-54.

Chinnery PF, Schon EA. Mitochondria. *J Neurol Neurosurg*

Psychiatry 2003; 74: 1188-99. Cirulli F, Micera A, Alleva E, Aloe L. Early maternal separation increases NGF expression in the developing rat hippocampus. *Pharmacol Biochem Behav.* 1998; 59: 853-8.

Clarke MC, Tanskanen A, Huttunen M, et al. Evidence for an interaction between familial liability and prenatal exposure to infection in the causation of schizophrenia. *Am J Psychiat.* 2009; 9: 1025-30.

Craddock N, Owen MJ. The kraepelinian dichotomy - going, going... But still not gone. *Br J Psychiatry.* 2010; 196:92-5.

David HP. Born Unwanted, 35 Years Later: The Prague Study. *Reprod Health Matters.* 2006; 14 (27) : 181-90.

De Oliveira GS, Ceresér KM, Fernandes BS, Sant'anna MK, Fries GR stertz L, Aguiar B, Pfaffenseller B, Kapczinski F. Decreased brain-derived neurotrophic factor in medicated and drug-free bipolar patients. *J Psychiatr Res.* 2009; 43: 1171-4.

De Oliveira L, Fraga DB, De Luca RD, Canever L, Ghedim FV, Matos MP, Streck EL, Quevedo J, Zugno AI. Behavioral changes and mitochondrial dysfunction in a rat model of schizophrenia induced by ketamine. *Metab Brain Dis.* 2011; 26: 69-77.

Dietrich-Muszalska A, Kontek B. Lipid peroxidation in patients with schizophrenia. *Psychiatry Clin Neurosci.* 2010; 64(5): 469-75.

Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF. The glutamate receptor ion Channels. *Pharmacol. Rev.* 1999; 51(1): 7-61.

Do KQ, Bovet P, Cuenod M. Schizophrenia: glutathione deficit as a new vulnerability factor for disconnectivity syndrome. *Schweiz Arch Neurol Psychiatr* 2004;155:375-85.

Do KQ, Cabungca JH, Frank A, Steullet P, Cuenod M. Redox Dysregulation neurodevelopment, and schizophrenia. *Curr Opin Neurobiol.* 2009; 19:220–30. Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1990; 186: 421-3.

Ellenbroek B A, Cools A R. The Long-Term Effects of Maternal Deprivation Depend on the Genetic Background. *Neuropsychopharmacology.* 2000; 1: 99-106.

Fischer JC, Ruitenbeek W, Berden JA, Trijbels JM, Veerkamp JH, Stadhouders AM, Sengers RC, Janssen AJ. Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. *Clin Chim Acta.* 1995; 153: 23-36.

Fraga DB, Deroza PF, Ghedim FV, Steckert AV, De Luca RD, Silverio A, Cipriano AL, Leffa DD, Borges GD, Quevedo J, Pinho RA, Andrade VM, Dal-pizzol F, Zugno AI. Prenatal exposure to

cigarette smoke causes persistent changes in the oxidative balance and in DNA structural integrity in rats submitted to the animal model of schizophrenia. *J Psychiatr Res.* 2011; 45(11):1497-503.

Fuchikami M, Yamamoto S, Morinobu S, Takei S, Yamawaki S. Epigenetic regulation of BDNF gene in response to stress. *Psychiatry Investig.* 2010; 7: 251-56.

Gama CS, Canevar L, Panizzutti B, Gubert C, Stertz L, Massuda R, Pedrini M, de Lucena DF, Luca RD, Fraga DB, Heylmann AS, Deroza PF, Zugno AI. Effects of omega-3 dietary supplement in prevention of positive, negative and cognitive symptoms: a study in adolescent rats with ketamine-induced model of schizophrenia. *Schizophr Res.* 2012; 141(2-3): 162-7.

Garcia LB, Comim CM, Valvassori SS, Réus GZ, Barbosa LM, Andreazza AC, Stertz L, Fries G, Gavioli E, Kapczinski F, Quevedo J. Acute administration of ketamine induces antidepressant-like effects in the forced swimming test and increases BDNF levels in the rat hippocampus. *Prog-Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2008; 32: 140-4.

Garcia LS, Comim CM, Valvassori SS, Réus GZ, Stertz L, Kapczinski F, Gavioli EC, Quevedo J. Ketamine treatment reverses behavioral and physiological alterations induced by chronic mild stress in rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2009; 30;33(3):450-5.

Ghedim FV, Fraga Dde B, Deroza PF, Oliveira MB, Valvassori SS, Steckert AV, Budni J, Dal-Pizzol F, Quevedo J, Zugno AI. Evaluation of behavioral and neurochemical changes induced by ketamine in rats: Implications as an animal model of mania. *J Psychiatr Res.* 2012; 46(12): 1569-75.

Golembo-Smith S, Schiffman J, Kline E, Sørensen HJ, Mortensen EL, Stapleton L, Hayashi K, Michelsen NM, Ekstrøm M, Mednick S. Premorbid multivariate markers of neurodevelopmental instability in the prediction of adult schizophrenia-spectrum disorder: a high-risk prospective investigation. *Schizophr Res.* 2012; 139(1-3):129-35.

Grune T, Reinheckel T, Davies KJA. Degradation of oxidized proteins in mammalian cells. *FASEB J.* 1997; 11: 526-34.

Gunawardana L, Smith GD, Zammit S, Whitley E, Gunnell D, Lewis S, Rasmussen F. Pre-conception inter-pregnancy interval and risk of schizophrenia. *Br J Psychiatry.* 2011; 199: 338-9.

Gunduz H, Woerner MG, Alvir JMJ, Degreef G, Lieberman JA. Obstetric complications in schizophrenia, schizoaffective disorder

and normal comparison subjects. *Schizophr Res* . 1999; 40(3, 21): 237-43.

Henquet C, Murray R, Linszen D, Van Os J. The environment and schizophrenia: the role of cannabis use. *Schizophr Bull*. 2005; 31: 608-12.

Horton AA , Fairhurst S , Bus J S. Lipid peroxidation and mechanisms of toxicity . *Crit Rev Toxicol*. 1987; 18 : (1) 27-79.

Hovatta I, Varilo T, Suvisaari J, Terwilliger JD, Ollikainen V, Arajärvi R, Juvonen H, Kokko- sahin M-L, Väisänen L, Mannila H, Lönnqvist, Peltonen L. A genomewide screen for schizophrenia genes in an isolated Finnish subpopulation, suggesting multiple susceptibility loci. *Am. J. Hum. Genet*. 1999; 65: 1114-24.

Hroudová J, Fisar Z. Connectivity between mitochondrial functions and psychiatric disorders. *Psychiatry Clin Neurosci*. 2011; 65(2):130-41.

Hughes BP. A method for estimation of serum creatine kinase and its use in comparing creatine kinase and aldolase activity in normal and pathologic sera. *Clin Chim*. 1962; 7: 597- 604.

Hughes JAM, Hanna MG. Mitochondrial encephalomyopathies: the enigma of genotype versus phenotype. *Biochem Biophys Acta*. 1999; 1410 : 125-45.

Hunt MJ, Raynaud B, Garcia R. Ketamine dose-dependently induces high-frequency oscillations in the nucleus accumbens in freely moving rats. *Biol Psychiatry*. 2006; 60(11):1206-14.

Isohanni M, Rantakallio P, Jones P, Hakko H, Isohanni I, Moring J, Myhrman A, T Mäkikyrö T, Räsänen P, Räsänen S, Tiihonen J. The predictors of schizophrenia in the 1966 Northern Finland birth cohort study. *Schizophr Res*. 1997; 24(1-2) :251-2.

Janssen B, Weinmann S, Berger M, Gaebel W. Validation of polypharmacy process measures in inpatient schizophrenia care. *Schizophr Bull* . 2004; 30 : (4)1023-33.

Jurcovicova J, Dobrakovova M. Repeated maternal deprivation alters behavioral pattern and attenuates prolactin response to mild stressor in adult male wistar rats. *Endocr Regul*. 1998; 32(3):161-5.

Karam CS, Ballon JS, Bivens NM, Freyberg Z, Girgis RR, Lizardi-ortiz JE, Markx S, Lieberman JA, Javitch J. Signaling pathways in schizophrenia: emerging targets and therapeutic strategies. *Trends Pharmacol Sci*. 2010; 31(8): 381-90.

Keefe Richard SE, Silva Susan G, Perkins Diana O, Lieberman Jeffrey A. The effects of atypical antipsychotic drugs on neurocognitive impairment in schizophrenia: a review and meta-

analysis. *Schizophr Bull.* 1999; 25 (2): 201-22.

Khan M M, Evans D R , Gunna V, Scheffer R E , Parikh V V , Mahadik S P. Reduced erythrocyte membrane essential fatty acids and increased lipid peroxides in schizophrenia at the never-medicated first-episode of psychosis and after years of treatment with antipsychotics. *Schizophr Res* . 2002; 58 (1):1-10 .

Khani S, Tayek JA. Cortisol increases gluconeogenesis in humans: its role in the metabolic syndrome. *Clin Sci.* 2001; 10 : 739-47.

Khuchua ZA, Qin W, Boero J, Cheng J, Payne RM, Saks VA, Strauss AW. Octamer formation and coupling of cardiac sarcomeric mitochondrial creatine kinase are mediated by charged N-terminal residues. *J Biol Chem.* 1998; 273: 22990-6.

Kitto, G.B. Intra- and extramitochondrial malate dehydrogenases from chicken and tuna heart. *Methods Enzymol.* 1969; 13: 106-16.

Klyushnik TP, Danilovskaya EV, Vatolkina OE, Turkova IL, Tsutsulkovskaya MY, Orlova VA, et al. Changes in the serum levels of autoantibody to nerve growth factor in patients with schizophrenia. *Neurosc Behav Physiol.* 1999; 29: 355- 57.

Kohen R, Nyska A. Invited Review: Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol.* 2002; 30 (6) 620-50.

Kraepelin E. Dementia Praecox and Paraphrenia. *J Nerv Ment Dis.* 1921; 54 (4).

Kunz M, Gama CS, Andreatza AC, Salvador M, Ceresér KM, Gomes FA, Belmonte-de- Abreu PS, Berk M, Kapczinski F. Elevated serum superoxide dismutase and thiobarbituric acid reactive substances in different phases of bipolar disorder and in schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2008; 32(7): 1677-81.

Kwon M, Fernández JR, Zegarek GF, Lo SB, Firestein BL. BDNF-promoted increases in proximal dendrites occur via CREB-dependent transcriptional regulation of cypin. *J Neurosci.* 2011; 31 (26): 9735-45.

Lahti AC, Weiler MA, Tamara Michaelidis BA, Parwani A, Tamminga CA. Effects of ketamine in normal and schizophrenic volunteers. *Neuropsychopharmacology.* 2001; 4, 455- 67.

Laruelle M. Dopamine transmission in the schizophrenic brain. In: (S. R. Hirsch & D. Weinberger) *Schizophrenia*. 2nd Edition (Blackwell). Oxford: Blackwell; 2003. 365-87.

Lee AL, Ogle WO, Sapolsky RM. Stress and depression: possible

links to neuron death in the hippocampus. *Bipolar Disord.* 2002; 4: 117-28.

Leucht S, Tardy M, Komossa K, Heres S, Kissling W, Salanti G, Davis JM. Antipsychotic drugs versus placebo for relapse prevention in schizophrenia: a systematic review. *Lancet.* 2012; 2;379(9831): 2063-71.

Levine RL, Garland D, Oliver CN. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 1990; 186: 464-78.

Li D, He L .Association study between the NMDA receptor 2Bsubunit gene (GRIN2B) and schizophrenia: A huge review and meta-analysis. *Genet Med.* 2007; 9(1):4-8.

Liddle PF. The symptoms of chronic schizophrenia. A re-examination of the positive-negative dichotomy. *Br J Psychiatry.* 1987; 151: 145-51.

Loeffen JL, Smeitink JA, Trijbels JM, et al. Isolated complex I deficiency in children: clinical, biochemical and genetic aspects. *Hum. Mutat.* 2000; 15: 123-34.

López-muñoz F, Alamo C, Cuenca E, Shen WW, Clervoy P, Rubio G. History of the discovery and clinical introduction of chlorpromazine. *Annals of Clinical Psychiatry.* 2005; 17(3):113-35.

Lowry OH, Rosebrough AL, Randal RJ. Protein measurement with the folinphenol reagent. *J Biological Chem.* 1951; 193: 265-75.

Lyubarev AE, Kurganov BI. Supramolecular organization of tricarboxylic acid cycle enzymes. *Biosystems.* 1989; 22: 91-102.

Mäki P, Veijola J, Joukamaa M, Läärä E, Hakko H, Jones PB, Isohanni M. Maternal separation at birth and schizophrenia—a long-term follow-up of the Finnish Christmas Seal Home Children. Original Research Article. *Schizophr Res.* 2003; 60 (1)13-9.

Mäki P, Riekkö T, Miettunen J, Isohanni M, Jones PB, Murray GK, Veijola J. Schizophrenia in the offspring of antenatally depressed mothers in the Northern Finland 1966 birth cohort: relationship to family history of psychosis. *Am J Psychiatry.* 2010; 167(1):70-7.

Manatt M, Chandra SB. The effects of mitochondrial dysfunction in schizophrenia. *J Med Genet Genomics.* 2011; 3 (5): 84-94.

Martinotti G, Di Iorio G, Marini S, Ricci V, De Berardis D, Di Giannantonio M. Nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor concentrations in schizophrenia: a review. *J Biol Regul Homeost Agents.* 2012; 26(3): 347-56.

Maurer I, Zierz S, Möller HJ. Evidence for a mitochondrial

oxidative phosphorylation defect in brains from patients with schizophrenia. *Schizophr Res.* 2001; 48:125-36.

McEwen BS. The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. *Brain Res.* 2000; 886: 172-89.

McGrath JJ, Féron FP, Burne THJ, Mackay-sim A, Eyles DW. The neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia: a review of recent developments. *Ann Med.* 2003; 35: (2)86-93. McGrath J, Saha S, Chant T, Welham J. Schizophrenia: a concise overview of incidence, prevalence, and mortality. *Epidemiol Rev.* 2008; 30: 67-76.

Mcquillen PS, Ferriero DM. Selective vulnerability in the developing central nervous system. *Pediatr Neurol.* 2004; 30, 227-35.

Meador-Woodruff JH, Healy DJ. Glutamate receptor expression in schizophrenic brain. *Brain Res Rev Reviews.* 2000; 31 (2-3): 288-94.

Mello PB, Benetti F, Cammarota M, Izquierdo I. Physical exercise can reverse the deficit in fear memory induced by maternal deprivation. *Neurobiol Learn Mem.* 2009; 92: 364-9. Meyer U, Feldon J; Epidemiology-driven neurodevelopmental animal models of schizophrenia. *Prog Neurobiol.* 2010; 90(3): 285-326.

Mifsud KR, Gutiérrez-Mecinas M, Trollope AF, Collins A, Saunderson EA, Reul JM. Epigenetic mechanisms in stress and adaptation. *Brain Behav Immun.* 2011; 25: 1305-15.

Morgan C, Kirkbride J, Leff J, Craig T, Hutchinson G, McKenzie K, Morgan K, Dazzan P, Doody GA, Jones P, Murray R, Fearon P. Parental separation, loss and psychosis in different ethnic groups: a case-control study. *Psychol Med.* 2007; 37: 495-503.

Murawiec S. Subjective aspects of psychopharmacology in schizophrenia. *Psychiatr Pol.* 1999; 33(1):25-35.

Nakazawa K, Zsiros V, Jiang Z, Nakao K, Kolata S, Zhang S, Belforte JE. GABAergic interneuron origin of schizophrenia pathophysiology. *Neuropharmacology.* 2012; 62(3):1574- 83.

Neveu I, Arenas E. Neurotrophins Promote the Survival and Development of Neurons in the Cerebellum of Hypothyroid Rats In Vivo. *J Cell Biol.* 1996; 133: 631-46.

Nordberg J, Arner ES. Reactive Oxygen Species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic. Biol. Med.* 2001; 31, 1287-312.

Numakawa T, Richards M, Adachi N, Kishi S, Kunigi H, Hashido K. MicroRNA function and neurotrophin BDNF. *Neurochem Int.* 2011; 59 (5) : 551-8.

Peluso MJ, Lewis SL, Barnes TRE, Jones P B.

Extrapyramidal motor side-effects of first and second-generation antipsychotic drugs. *Br. J. Psychiatry.* 2012; 200:387-92 .

Perez-polo JR, Dy P, Westlund K, Hall K, Livingston K. Levels of serum nerve growth factor in schizophrenia. *Birth Defects Orig Artic Ser.* 1978;14(5):311-21.

Petroff OA. GABA and glutamate in the human brain. *Neuroscientist.* 2002; 8(6): 562-73. Pilla C, Cardozo RF, Dutra-filho CS, Wyse AT, Wajner M, Wannmacher CM. Creatine kinase activity from rat brain is inhibited by branched-chain amino acids in vitro. *Neurochem Res.* 2003; 28: 675-9.

Prabakaran S, Swatton JE, Ryan MM, Huffaker SJ, Huang JTJ, Griffin JL. Mitochondrial dysfunction in schizophrenia: evidence for compromised brain metabolism and oxidative stress. *Mol Psychiatry.* 2004; 9:684-97.

Prince JA, Blennow K, Gottfries CG, Karlsson I, Orelund L. Mitochondrial function is differentially altered in the basal ganglia of chronic schizophrenics. *Neuropsychopharmacol* 1997; 21:372-9.

Quibell R, Prommer E E, Mihalyo M, Twycross R, Wilcock A. Ketamine. *J Pain Symptom Manage.* 2011; 41 (3): 640-9.

Ramalingam M, Kim SJ. Reactive oxygen/nitrogen species and their functional correlations in neurodegenerative diseases. *J Neural Transm.* 2012; 119(8): 891-910.

Réus GZ, Stringari RB, Ribeiro KF, Cipriano AL, Panizzutti BS, Stertz L, Lersch C, Kapczinski F, Quevedo J. Maternal Deprivation Induces Depressive-like Behaviour and Alters Neurotrophin Levels in the Rat Brain. *Neurochem Res.* 2011; 36: 460-6.

Rezin GT, Gonçalves CL, Daufenbach JF, Fraga DB, Santos PM, Ferreira GK, Hermani FV, Comim CM, Quevedo J, Streck EL. Acute administration of ketamine reverses the inhibition of mitochondrial respiratory chain induced by chronic mild stress. *Brain Res Bull.* 2009; 79(6): 418-21.

Rezin GT, Gonçalves CL, Daufenbach JF, Silvam MC, Borges LS, Vieira JS, Herman FV, Comim CM, Quevedo J, Streck EL. Effect of chronic administration of ketamine on the mitochondrial respiratory chain activity caused by chronic mild stress. *Acta Neuropsychiatr.* 2010; 22: (6) 292-9.

Rezin GT, Gonçalves CL, Daufenbach JF, Fraga DB, Santos PM, Ferreira GK, Hermani FV, Comim CM, Quevedo J, Streck EL. Acute administration of ketamine reverses the inhibition of mitochondrial respiratory chain induced by chronic mild stress. *Brain Res Bull.* 2009; 79(6):418-21.

Roceri M, Cirulli F, Pessina C, Peretto P, Racagni G, Riva MA. Postnatal repeated maternal deprivation produces age-dependent changes of brain-derived neurotrophic factor expression in selected rat brain regions. *Biol Psychiatry* . 2004; 55 (7): 708–14.

Rodrigues SM, Bauer EP, Farb CR, Schafe GE, Ledoux JE. The group I metabotropic glutamate receptor mGluR5 is required for fear memory formation and long-term potentiation in the lateral amygdala. *J Neurosci* . 2002; 22 (12): 5219-29.

Rustin P, Chretien D, Bourgeron T, et al. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clin Chim Acta*. 1994; 228: 35-51.

Schapira AH, Cooper JM, Morgan-hughes LA, Landon DN, Clark JB. Mitochondrial myopathy with a defect of mitochondrial-protein transport. *N. Engl.J.Med*. 1990; 1:(323) 37- 42.

Scherz-Shouval R, Eleazar Z. ROS, mitochondria and the regulation of autophagy. *Trends Cell. Biology*. 2007; 17: 422-7.

Schlattner U, Wallimann T. Octamers of mitochondrial creatine kinase isoenzymes differ in stability and membrane binding. *J Biol Chem*. 2000; 275: 17314-20.

Soppet D, Escandon E, Maragos J, Middlemas DS, Reid SW, Blair J, Burton LE, Stanton BR, Kaplan DR, Hunter T, Nikolics K, Parada LF. The neurotrophic factors brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 are ligands for the trkB tyrosine kinase receptor. *Cell*. 1991; 65. 895-903.

Tandon R, Keshavan MS, Nasrallah HA. Schizophrenia, "Just the Facts": what we know in 2008 part 1: overview. *Schizophr Res*. 2008; 100(1-3):4-19.

Takase K, Yamamoto Y, Yagami T. Maternal deprivation in the middle of a stress hyporesponsive period decreases hippocampal calcineurin expression and causes abnormal social and cognitive behaviours in adult male Wistar rats: relevance to negative symptoms of schizophrenia. *Behav Brain Res*. 2012; 232(1):306-15.

Thornicroft G, Tansella M, Becker T, Knapp M, Leese M, Schene A, Vazquez-barquero JL. The personal impact of schizophrenia in Europe . *Schizophr Res* . 2004; 69 2-3 (1):125-32.

Tienari P, Wynne LC, Sorri A, Lahti I, Läksy K, Moring J, Naarala M, Nieminen P, Wahlberg K. Genotype-environment interaction in schizophrenia-spectrum disorder : Long-term follow- up study of Finnish adoptees. *Br J Psychiatry*. 2004; 184: 216-22.

Torgalsbøen AK, Rund BR. "Full recovery" from schizophrenia in the long term: a ten-year follow-up of eight former schizophrenic

patients. *Psychiatry*. 1998;61(1): 20-34.

Tyler WJ, Pozzo-miller LD. BDNF enhances quantal neurotransmitter release and increases the number of docked vesicles at the active zones of hippocampal excitatory synapses. *J. Neurosci*. 2001; 21: 4249-58.

Uysal N, Gonenc S, Acikgoz O, Pekçetin C, Kayatekin BM, Sonmez A, Semin I. Age- dependent effects of maternal deprivation on oxidative stress in infant rat brain. *Neurosci Lett*. 2005; 384(1-2): 98-101.

Van os J. Does the urban environment cause psychosis? *Br J Psychiatry*. 2004; 184(4):287-8.

Vélot C, Mixon MB, Teige M, Srere PA. Model of a quinary structure between Krebs TCA cycle enzymes: A model for the metabolon. *Biochemistry*. 1997; 36(47): 14271-6.

Verdoux H, Van os J. Psychotic symptoms in non-clinical populations and the continuum of psychosis. *Schizophr Res*. 2002; 54(1-2):59-65.

Voet D, Voet JG. *Biochemistry*. 3^a ed (John Wiley & Sons). Nova Jérsey: John Wiley & Sons; 2004.

Watanabe M, Maemura K, Kanbara K, Tamayama T, Hayasaki H. GABA and GABA receptors in the central nervous system and other organs. *Int Rev Cytol* . 2002; 213 : 1-47.

World Health Organisation (WHO). The global burden of disease: 2004 update. Geneva, 2004. Disponível em www.who.int. Acessado em 30/11/2012.

Wyss M, Kaddurah-Daouk R. Creatine and creatinine metabolism. *Physiol Rev*. 2000; 80:1107-213.

Xiong P, Zeng Y, Wan J, Xiaohan DH, Tan D, Lu J, Xu F, Li HY, Zhu Z, Ma M. The role of NGF and IL-2 serum level in assisting the diagnosis in first episode schizophrenia. *Psychiatry Res*. 2011; 189(1):72-6.

Yadava N, Nichols DG. Spare respiratory capacity rather than oxidative stress regulates glutamate excitotoxicity after partial respiratory inhibition of mitochondrial complex I with rotenone. *J Neurosc*. 2007; 27 (27): 7310-7.

Yager S, Forlenza MJ, Miller GE. Depression and oxidative damage to lipids. *Psychoneuroendocrinology*. 2010; 35: 1356-62.

Zhang M, Zhao Z, He L, Wan C. A meta-analysis of oxidative stress markers in schizophrenia. *Sci China Life Sci*. 2010; 53: 112-24.