

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

HELDER LUCAS CHIPINDO

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO ÔMEGA-3 SOBRE
PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS E BIOQUÍMICOS DE
RATOS WISTAR SUBMETIDOS AO MODELO ANIMAL DE
ESQUIZOFRENIA INDUZIDO PELA ADMINISTRAÇÃO DE
CETAMINA**

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde, para obtenção
do título de Doutor em Ciências da
Saúde.

Orientadora: Prof. Dra. Alexandra
Ioppi Zugno

Co-orientadora: Prof. Dra. Ana
Maria Volpato

**CRICIÚMA
2013**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

C541 Chipindo, Helder Lucas.

Avaliação dos efeitos do ômega-3 sobre parâmetros comportamentais e bioquímicos de ratos wistar submetidos ao modelo animal de esquizofrenia induzido pela administração de cetamina / Helder Lucas Chipindo ; orientadora: Alexandra Ioppi Zugno ; co-orientadora: Ana Maria Volpato. – Criciúma, SC : Ed. do Autor, 2013.

88 p. : il.; 21 cm.

Tese (Doutorado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2013.

1. Esquizofrenia. 2. Ácidos graxos Ômega-3. 3. Estresse oxidativo. 4. Cetamina. 5. Fator neurotrófico Derivado do encéfalo. I. Título.

CDD. 22. ed. 616.8982

FOLHA INFORMATIVA

Esta tese 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 Nº 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 Tese de DOUTORADO apresentada pelo candidato **Helder Lucas Chipindo** sob o título “**Avaliação dos efeitos do ômega 3 sobre parâmetros comportamentais e bioquímicos de ratos Wistar submetidos ao modelo animal de esquizofrenia induzido por cetamina**” para obtenção do grau de **DOUTOR EM CIÊNCIAS DA SAÚDE** do Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

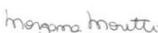
Após haver analisado o referido trabalho e arguido o candidato, os membros são de parecer pela “**APROVAÇÃO**” da Tese, com conceito A.

Criciúma, SC, 25 de julho de 2013.


Profa. Dra. Patricia Fernanda Schuck
Membro/Relator - UNESC


Prof. Dr. Nelo Eidy Zanchi
Membro Interno – UNESC


Prof. Dr. Rodrigo Bainy Leal
Membro Externo - UFSC


Profa. Dra. Morgana Moretti
Membro Externo - UFSC


Profa. Dra. Alexandra Toppi Zugno
Orientadora


Prof. Dr. Emilio Luiz Streck
Coordenador do PPGCS

À minha Mãe e meu Pai, Laurinda Graciano Chipindo e Arão Chipindo, que desde pequeno me ensinaram a humildade, a persistência e a insistência como instrumentos para o sucesso, o vosso amor e carinho faz deste momento um fato possível. Amo-vos infinitamente!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente A DEUS por me cuidar e permitir chegar a este momento.

Aos meus Pais Arão Chipindo e Laurinda Graciano Chipindo, pelos sacrifícios que fizeram para criar nove filhos em momento de guerra e pela forma rigorosa e amável que me educaram para me tornar um verdadeiro homem, vocês são especiais.

À professora Alexandra Ioppi Zugno pela oportunidade que me concedeu para desenvolver este trabalho, ensinamentos transmitidos, atenção e confiança depositada que contribuíram para o meu desenvolvimento e amadurecimento científico.

À professora Ana Maria Volpato, minha co-orientadora, exemplo de maturidade profissional cuja contribuição foi imprescindível para realização deste trabalho.

Aos integrantes do laboratório de Neurociências e Fisiopatologia do programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da UNESC, muito obrigado pelo empenho na execução deste trabalho.

Ao colega Felipe Damázio Pacheco pelo apoio durante a elaboração deste trabalho.

À Amanda Ely por dispor-se em revisar a parte escrita deste trabalho.

À minha querida e amada esposa Adalia Chipindo por ser uma pessoa sempre presente e incansável e que me transmitiu muito carinho e amor durante estes anos de formação, eu te amo.

Aos meus filhos Heldson, Herilson e Heldmaura, vocês são o motivo das minhas lutas e muito obrigado por todo carinho que me deram na minha ausência e presença em Angola.

Ao meu colega, amigo e irmão Eng^o Bonifacio Vissetaca, muito obrigado por todo apoio e colaboração e acima de tudo pelo seu caráter sempre humano que Deus derrame alegria em sua vida e de sua família, juntos fizemos uma grande equipe.

Aos meus irmãos Neto, Octavio, Anacleto, Eduardo, Esperança, Elsa, Orlando, Salome, Odeth, Pedrito e Geraldo, muito obrigado pelo incentivo e a atenção.

A minha mãe sogra Emilia, muito obrigado por apoiar minha esposa e filhos em momentos de doença e na minha ausência.

Ao Arlindo Afonso, obrigado companheiro, por tudo.

As minhas amigas, amigos, colaboradores e colegas da

Universidade José Eduardo dos Santos e da JUPV, o meu muito obrigado.

E finalmente, a todos que tornaram este estudo possível, os meus mais sinceros agradecimentos!

“As nossas vidas basicamente mudam de duas formas: através das
pessoas que conhecemos e dos livros que lemos”.

Harvey Mackay

RESUMO

A esquizofrenia é uma condição psiquiátrica grave, com fisiopatologia complexa. O surgimento dos sintomas da doença é precoce, geralmente na adolescência. Na busca de estratégias eficazes no tratamento da doença, estudos com suplementação de ômega-3 têm demonstrado efeitos preventivos em pacientes com alto risco de desenvolvimento da doença. Nesse contexto, o presente estudo objetivou testar a hipótese de que o ácido graxo poli-insaturado ômega-3 previne alterações comportamentais e bioquímicas em animais submetidos ao modelo animal de esquizofrenia induzido por administração de cetamina. A pesquisa utilizou um total de 60 ratos wistar machos jovens, com idade entre 28 e 30 dias pesando entre 80g e 150g. Os ratos foram inicialmente divididos em dois grupos (30 animais por grupo) para a suplementação com Ômega-3 ou veículo durante 21 dias. A partir do décimo quinto dia, ambos os grupos foram novamente divididos para tratamento com salina ou cetamina (25mg/kg), administrada uma vez ao dia até o vigésimo primeiro dia. Ao final, foram formados os seguintes grupos: Veículo+salina, Ômega+salina, Veículo+cetamina, Ômega+cetamina. No último dia de intervenções (51º dia) os animais foram mortos por decapitação e as estruturas cerebrais (estriado, hipocampo e córtex pré-frontal.) foram dissecadas, congeladas em nitrogênio líquido e mantidas em freezer -80°C para análises bioquímicas posteriores. As análises englobaram testes como: teste de inibição por prepulso, análise do estresse oxidativo, atividade e expressão gênica da enzima acetilcolinesterase, níveis de BDNF e interleucinas. Os resultados indicam que a suplementação com Ômega-3 foi capaz de prevenir a diminuição da inibição por prepulso induzida pelo tratamento com cetamina. Além disso, o Ômega-3 é capaz de modular a resposta antioxidante nas estruturas cerebrais através de alterações nas enzimas antioxidantes. Da mesma forma, o Ômega-3 previne dano em proteínas e lipídios induzidos pelo tratamento com cetamina. A respeito da enzima acetilcolinesterase, a suplementação com Ômega-3 foi capaz de prevenir parcialmente o aumento da atividade da enzima induzido pela administração de cetamina. Os níveis de BDNF mostraram-se diminuídos uma hora e 24 horas após a última injeção de cetamina somente em córtex pré-frontal de ratos tratado com cetamina isoladamente, enquanto ratos suplementados e tratados com cetamina apresentam diminuição dos níveis de BDNF somente após 24 horas da última injeção. Em contraste, ambas as intervenções

(suplementação e tratamento) induziram respostas similares nos níveis de interleucinas (IL1 β e IL6) tanto uma hora como 24 horas após a morte. Estas evidências confirmam a nossa hipótese de que o ácido graxo poli-insaturado Ômega-3 previne alterações comportamentais e bioquímicas em animais submetidos ao modelo animal de esquizofrenia induzido por administração de cetamina. Ainda, sugere-se que novos estudos sejam desenvolvidos para elucidar os mecanismos pelos quais o Ômega-3 previne tais alterações associadas à esquizofrenia em humanos.

Palavras-chave: Esquizofrenia; ômega-3; esquizofrenia; cetamina; acetilcolinesterase; BDNF.

ABSTRACT

Schizophrenia is a severe psychiatric condition, whose onset of symptoms is early, usually in adolescence. Searching for effective strategies to treat the disease, studies with Omega-3 supplementation have demonstrated preventive effects in patients at high risk of developing the disease. In this context, the present study aimed to test the hypothesis that omega-3 polyunsaturated fatty acids prevent behavioral and biochemical changes in rats subjected to the animal model of schizophrenia induced by ketamine. The research used a total of 60 young male Wistar rats, aged between 28 and 30 days weighing between 80 g and 150g. Rats were initially divided into two groups (30 animals per group) to supplementation with Omega-3 or vehicle for 21 days. From the fifteenth day, both groups were again divided to treatment with saline or ketamine (25mg/kg) administered once a day to the twentieth day. At the end, the following groups were formed: vehicle +saline, saline+Omega, vehicle +ketamine, ketamine+Omega. On the last day of intervention (51 days later), the animals were killed by decapitation and the brain structures (striatum, hippocampus and prefrontal. cortex) were dissected, frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C for subsequent biochemical analyzes. The analysis is encompassed tests as testing prepulse inhibition, analysis of oxidative stress, gene expression and activity of the enzyme acetylcholinesterase, BDNF level and interleukins. The results indicate that supplementation of Omega-3 was able to prevent the reduction in prepulse inhibition induced by treatment with ketamine. In addition, Omega-3 is capable of modulating the antioxidant response in brain structures through changes in antioxidant enzymes. Similarly, Omega-3 prevents damage to lipids and proteins induced by treatment with ketamine, and it was able to partially prevent the increasing in the acetylcholinesterase enzyme activity induced by ketamine. BDNF levels are decreased one hour after the last injection only in the prefrontal cortex of rats treated with ketamine alone, whereas rats treated with ketamine and supplemented had this effect prevented after one hour, but not 24 hours of after the last injection. These evidences confirm our hypothesis that the polyunsaturated fatty acid omega-3 prevents biochemical and behavioral changes in animals subjected to the animal model of schizophrenia induced by ketamine. Further studies are necessary to elucidate the mechanisms by which the Omega-3 prevents such alterations associated with schizophrenia in humans.

Keywords: Schizophrenia, Omega-3; schizophrenia, ketamine, acetylcholinesterase; BDNF.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh –Acetilcolina (do inglês: acetylcholine)
AChE –Acetilcolinesterase (do inglês: acetylcholinesterase)
ALA α – Ácido Linoleico (do inglês: Linoleic Acid)
ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BDNF - Fator neurotrófico derivado do cérebro (do inglês: Brain Derived Neurotrophin fator)
CAT - Catalase
CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CK - Creatina Cinase (do inglês: Creatine Kinase)
COX 1 - Ciclo-oxigenase 1
COX 2- Ciclo-oxigenase 2
LCR –Líquido Cefalo-Raquidiano
DHA – Ácido Docosaexaenoico (do inglês: Docohexanoic acid)
DNPH – Dinitrofenilidrazina (do inglês: Dinitrophenylhydrazine)
EPA - Ácido eucosapentanoico (do inglês: eucosapentanoic acid)
EROS-Espécies Reativas de Oxigênio
GSH – Glutathiona reduzida
GPX - Glutathiona peroxidase
H₂O₂ -Peróxido de Hidrogênio
ICAM 1- Molécula solúvel de adesão inter-celular 1
IL 6 - Interleucina 6
IL1 -Interleucina 1
KYA- Cinurenina (do inglês: kirunenic acid)
LA - Ácido linoleicos (do inglês: linolenic acid)
LC- PUFAS - Ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (do inglês: Poly-unsaturated fatty acids)
OMS-Organização Mundial de Saúde
P - Pulso
PET-Tomografia por emissão de pósitons
PGE2 - Prostaglandinas 2
PLA2- Ativação da enzima fosfolipase
PP - Pré-Pulso e Pulso
SBNec - Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento
SNC- Sistema Nervoso Central
SOD - Superoxido desmutase
SPET- Tomografia por emissão de fóton único
TBARS – Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbiturico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	27
1.1 FISIOPATOLOGIA	28
1.1.1 Teoria dopaminérgica.....	28
1.1.2 Teoria glutamatérgica.....	29
1.1.3 Tratamento	31
1.2 MARCADORES INFLAMATÓRIOS.....	32
1.3 FATOR NEUROTROFICO DERIVADO DO CÉREBRO (BDNF)	34
1.4 ESTRESSE OXIDATIVO	35
1.5 SISTEMA COLINÉRGICO	36
2 ÔMEGA-3 E A HIPÓTESE FOSFOLIPDICA.....	38
2.1 MODELO ANIMAL DE ESQUIZOFRENIA E CETAMINA	39
3 OBJETIVOS.....	41
3.1 OBJETIVO GERAL.....	41
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
3.3 HIPÓTESES.....	41
4 METODOLOGIA.....	42
4.1 ASPECTOS ÉTICOS.....	42
4.2 ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	42
4.3 SUPLEMENTAÇÃO DOS ANIMAIS COM ACIDO GRAXO POLI- INSATURADO ÔMEGA-3.....	43
4.4 CETAMINA	44
4.5 TESTE COMPORTAMENTAL E ANÁLISES BIOQUÍMICAS	44
4.5.1 Teste de Inibição por prepulso	44
4.5.2 O dano oxidativo a lipídios e proteínas	45
4.5.3 Atividade de enzimas antioxidantes.....	45
4.5.4 Avaliação da atividade da enzima acetilcolinesterase.....	46
4.5.5 Análise da expressão gênica de AChE (RT-PCR).....	46
4.5.6 Determinação de Interleucinas e BDNF.....	47
5 RESULTADOS.....	49
5.1 A PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO POR PREPULSO E DANO OXIDATIVO EM RATOS JOVENS SUPLEMENTADOS COM ÔMEGA-3 E SUBMETIDOS AO MODELO ANIMAL DE ESQUIZOFRENIA INDUZIDO POR CETAMINA	49
5.1.1 Análise comportamental.....	49
5.1.3 Dano em lipídios e proteínas	53
5.2 ATIVIDADE E EXPRESSÃO GÊNICA DA AChE EM TECIDOS CEREBRAIS DE RATOS JOVENS SUPLEMENTADOS COM ÔMEGA-3 E SUBMETIDOS AO MODELO ANIMAL DE ESQUIZOFRENIA INDUZIDO POR CETAMINA	55

5.3 NÍVEIS DE INTERLEUCINAS (24 HORAS APÓS A ÚLTIMA ADMINISTRAÇÃO DE CETAMINA) EM TECIDOS CEREBRAIS DE RATOS JOVENS SUPLEMENTADOS COM ÔMEGA-3 E SUBMETIDOS AO MODELO ANIMAL DE ESQUIZOFRENIA INDUZIDO POR CETAMINA.....	57
5.4 NÍVEIS DE BDNF (1 HORA E 24 HORAS APÓS A ÚLTIMA ADMINISTRAÇÃO DE CETAMINA) EM TECIDOS CEREBRAIS DE RATOS JOVENS SUPLEMENTADOS COM ÔMEGA-3 E SUBMETIDOS AO MODELO ANIMAL DE ESQUIZOFRENIA INDUZIDO POR CETAMINA.....	59
6 DISCUSSÃO.....	62
6.1 A PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO POR PRÉ-PULSO	62
6.2. PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO	62
6.3 ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE (AChE)	64
6.4 OS NÍVEIS DE INTERLEUCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS.....	66
6.5 OS NÍVEIS DE BDNF EM TECIDOS	68
7 CONCLUSÃO.....	70
REFERÊNCIAS.....	71

1 INTRODUÇÃO

A esquizofrenia é considerada o mais grave dos transtornos psiquiátricos e afeta cerca de 1% da população mundial. O indivíduo acometido pode apresentar alucinações, delírios, desorganização da fala e do comportamento, apatia e deterioração do funcionamento social. Além disso, estima-se que cerca de 4,9% dos pacientes com diagnóstico de esquizofrenia cometem suicídio (Palmer et al., 2005). Apesar dos progressos no tratamento da esquizofrenia a partir da introdução de antipsicóticos atípicos, a eficácia clínica do tratamento continua sendo bastante limitada. Nesse sentido, poucos são os indivíduos que voltam a ter o funcionamento compatível com as expectativas pré-mórbidas (Kapur e Seeman, 2001).

Diferentes abordagens científicas (modelos animais, estudos neuroendocrinológicos, *post mortem*, psicofarmacológicos, genéticos e de neuroimagem) tem sido empregadas para investigar a esquizofrenia. Entretanto, a sua fisiopatologia ainda é pouco conhecida. Uma melhor compreensão da fisiopatologia da esquizofrenia é essencial para que tratamentos mais eficazes sejam desenvolvidos (Karam et al., 2010).

Estudos conduzidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS) relatam que a estimativa acerca da incidência da doença é de sete casos novos por ano para cada 10.000 habitantes, sendo a incidência masculina (5,7 casos) superior à feminina (4,6 casos). Da mesma forma, no Brasil, os estudos epidemiológicos apresentam estimativas de incidência e prevalência compatíveis com as observadas pela OMS (Mari e Leitão, 2000).

O diagnóstico da esquizofrenia é complexo, baseado em características clínicas de vários aspectos como a sintomatologia, curso e exclusão de outros diagnósticos médicos. Os sintomas são agrupados em três categorias: sintomas positivos (delírios e alucinações), negativos (embotamento afetivo, avolia, anedonia, alogia, apatia e isolamento social) e de desorganização (comportamento estranho, por vezes bizarro, pensamento desorganizado, afeto inapropriado, sintomas cognitivos como alteração da memória de trabalho e prejuízo na atenção) (Kapur e Seeman, 2001).

1.1 FISIOPATOLOGIA

A esquizofrenia é uma das mais intrigantes e também estudadas condições psiquiátricas. A riqueza psicopatológica e as características clínicas, tais como o seu início na adolescência e o curso deteriorante sem grandes alterações neurológicas, despertam curiosidade e geram um número considerável de pesquisas sobre os processos neurofisiológicos envolvidos na doença (DeLisi, 2008).

1.1.1 Teoria dopaminérgica

A teoria dopaminérgica indica que alterações nos níveis de dopamina seriam responsáveis pelos sintomas observados na esquizofrenia. A primeira evidência *in vivo* de que há uma desregulação de neurônios dopaminérgicos na esquizofrenia provém do estudo desenvolvido por Laruelle et al. (1996). No referido estudo, foi observado através de PET (tomografia por emissão de pósitrons) e SPECT (tomografia por emissão de fóton único) que existe um maior aumento na liberação de dopamina após administração de anfetamina em pacientes esquizofrênicos quando comparados a controles (Abi-Dargham e Laruelle, 2005).

A dopamina é um neurotransmissor catecolaminérgico e cerca de 80% do seu volume no sistema nervoso central(SNC) encontra-se no estriado, enquanto que o restante encontra-se distribuído difusamente pelo córtex e outras regiões cerebrais. Os receptores dopaminérgicos (D2, D3, D4) são metabotrópicos (acoplados à proteína G) e podem ser encontrados nas regiões pré e pós-sinápticas (Vallone et al., 2000).

A hipótese dopaminérgica clássica da esquizofrenia postula que os sintomas positivos da doença sejam secundários a uma hiperatividade dopaminérgica subcortical ou, mais precisamente, mediados pelos receptores dopaminérgicos do tipo D2 da via dopaminérgica mesolímbica (Laruelle et al., 1996; Abi-Dargham e Laruelle, 2005). Esta hipótese é sustentada por duas observações principais, a saber: a) o uso continuado de agonistas dopaminérgicos D2 induz sintomas similares aos sintomas positivos da esquizofrenia e, b) toda medicação antipsicótica efetiva, necessariamente bloqueia em algum grau os receptores D2 (Abi-Dargham e Laruelle, 2005). Além disso, Seeman et al.(1975) demonstraram que existe uma relação entre a potência dos diferentes antipsicóticos e sua afinidade pelos receptores

dopaminérgicos D2. Sabe-se também que todos os antipsicóticos bloqueiam receptores D2, mas com diferentes graus de afinidade (Talbot e Laruelle, 2002). Há ainda uma relação entre o grau de ocupação dos receptores D2, a resposta clínica e os sintomas extrapiramidais (Kapur et al., 2000).

Ademais, uma formulação mais recente sugere que uma hipofunção dopaminérgica no córtex pré-frontal seria responsável pelos sintomas negativos e um evento primário na esquizofrenia. Essa hipofunção inicial acarretaria uma hiperfunção dopaminérgica secundária no estriado, o que, por sua vez, levaria ao surgimento dos sintomas positivos (Stone et al., 2007). Portanto, acredita-se que um déficit na atividade dopaminérgica cortical e um aumento de atividade dopaminérgica subcortical coexistam na doença (Abi-Dargham e Laruelle, 2005).

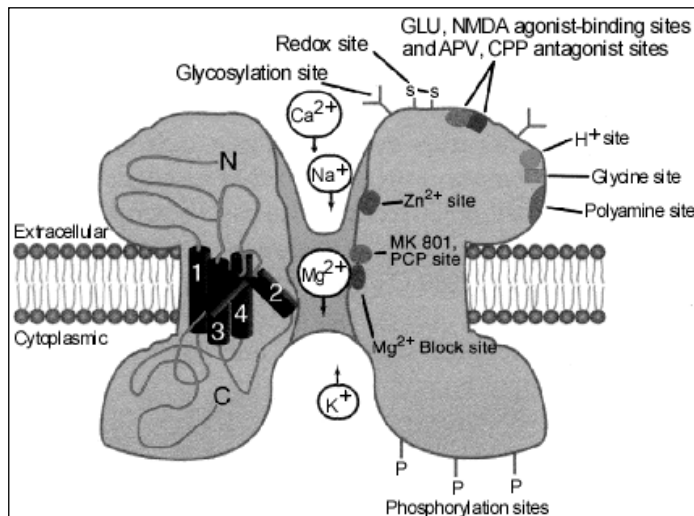
1.1.2 Teoria glutamatérgica

A teoria glutamatérgica surgiu apartir da evidência de que há diminuição dos níveis de glutamato em pacientes esquizofrênicos (Kim et al., 1980). O glutamato, ilustrado na Figura 1, é o principal neurotransmissor excitatório existente no cérebro e possui importante papel na migração neuronal, no desenvolvimento de neurites, na sinaptogênese e na poda neuronal por apoptose. Para que a via glutamatérgica seja ativada, é necessário que o receptor NMDA “libere” o influxo de íons para o neurônio. Essa ativação é dependente de três fatores: ligação de uma glicina, despolarização da membrana pós-sináptica e ligação de uma molécula de glutamato. Em pacientes esquizofrênicos, acredita-se que haja uma hipofunção dos receptores NMDA, de modo que essa via excitatória a partir do glutamato seja inibida (Zigmond et al., 1999).

Essa hipótese ganhou força quando o fármaco psicotomimético fenciclidina (bloqueador do canal iônico do receptor NMDA) passou a ser estudado (Olney e Farber, 1995; Heresco-Levy, 2003; Abi-Dargham e Laruelle, 2005). A cetamina é capaz de induzir tanto os sintomas positivos como os negativos e cognitivos da doença em pacientes esquizofrênicos (Krystal et al., 1994; Lahti et al., 1995). Da mesma forma, a infusão intravenosa de cetamina em indivíduos saudáveis induz delírios, desorganização, ilusões visuais e auditivas e um estado amotivacional marcado por embotamento afetivo, isolamento e retardo psicomotor (Karam et al., 2010). Portanto, fatores ambientais que

possam alterar a função dos receptores glutamatérgicos e induzir efeitos comportamentais semelhantes à esquizofrenia funcionam como um modelo de estudo da fisiopatologia da doença (Goff e Coyle, 2001; Abi-Dargham e Laruelle, 2005).

Figura 1- Sítios de ligação do NMDA



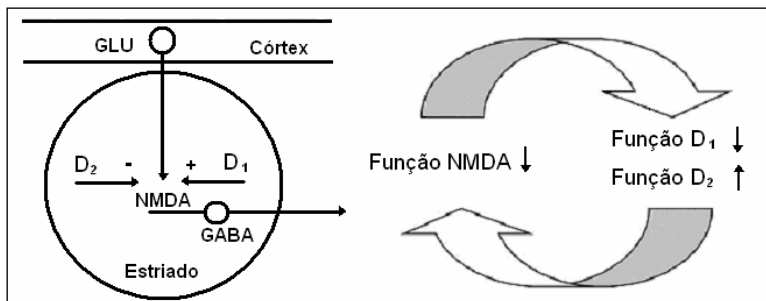
Adaptado a partir de Waxman MN. Neurotransmitter Receptors. In: Zigmond MJ, et al.; 1999.)

Ainda, há evidências sugerindo que a desregulação dopaminérgica encontrada na esquizofrenia pode ser secundária a um déficit na função do receptor glutamatérgico NMDA (Jentsch e Roth, 1999). Entretanto, uma desregulação dopaminérgica também causa alterações na transmissão glutamatérgica, uma vez que aferências glutamatérgicas corticais e projeções dopaminérgicas convergem em sinapses envolvendo neurônios GABAérgicos no estriado (Kotter, 1994; Cepeda e Levine, 1998).

De uma maneira geral, mostrou-se que os receptores D1 e D2 apresentam papéis antagônicos em relação à transmissão glutamatérgica via receptor NMDA no estriado (Cepeda e Levine, 1998; Abi-Dargham e Laruelle, 2005). Como representado na Figura 2, a estimulação dos receptores D2 inibe a transmissão glutamatérgica através do receptor NMDA, enquanto que a estimulação dos receptores D1 tem efeito contrário (Cepeda e Levine, 1998; Abi-Dargham e Laruelle, 2005).

Assim, tanto as interações glutamato/dopamina quanto as dopamina/glutamato parecem ser relevantes para a fisiopatologia da doença.

Figura 2- Receptores dopaminérgicos D1 e D2



Esquema ilustrando que receptores dopaminérgicos D1 e D2 apresentam efeitos opostos na modulação da transmissão glutamatérgica via NMDA em neurônios GABAérgicos do estriado. Direita: representação esquemática dos três desbalanços neuroquímicos principais presentes nos cérebros de pacientes esquizofrênicos, evidenciando suas intercorrelações através de *loops* de retroalimentação positiva (Fonte: Abi-Dargham e Laruelle, 2005).

1.1.3 Tratamento

A esquizofrenia é geralmente tratada com uma combinação de psicoterapia e ajustes sociais, bem como administração de fármacos. Em 1958, uma classe de fármacos (butiromfenonas) foi sintetizada, tendo como protótipo o haloperidol (Janssen, 1996), introduzido na clínica em 1959 (Divry et al., 1959). Dentro desse grupo de antipsicóticos conhecidos como típicos ou de primeira geração, os mais utilizados atualmente são: clorpromazina, promazina, haloperidol, tioridazina, estelazina, trifluoperazina, tiotixene e sulpirida. Existe uma ampla incidência de efeitos colaterais extrapiramidais em pacientes tratados com essa classe de medicamentos (Kapur e Remington, 2001).

Em contrapartida, os atípicos são considerados por alguns clínicos mais interessantes que os típicos, por apresentarem maior espectro de atuação (particularmente em relação aos sintomas negativos, cognitivos e relacionados ao humor) e maior segurança em relação à manifestação de efeitos colaterais motores agudos e de longa duração

(Kapur e Remington, 2001; Meltzer, 2004; Tandon, 2007). Em consequência disso, há um consenso entre médicos e associações médicas recomendando o uso desses novos agentes (Kane et al., 2003; Lehman, 2004; Miller et al., 2004; Falkai et al., 2005).

Considera-se importante ressaltar que a eficácia dos antipsicóticos típicos está relacionada ao bloqueio dos receptores dopaminérgicos principalmente D2 (Lehman et al., 2004), enquanto que os antipsicóticos denominados de segunda geração, introduzidos no mercado desde 1990 e tendo como protótipo a clozapina, agem antagonizando diferentes tipos de receptores incluindo receptores de dopamina (D1, D2, D3, D4, D5), serotonina (5-HT1A, 5-HT2A, 5-HT2c), muscarínicos (M1, M2, M3, M5), alfa1 e alfa2 adrenérgicos, e receptores histamínicos(H1) (Lehman et al., 2004).

Atualmente novos antipsicóticos atípicos têm apresentado melhor ação terapêutica contra os sinais negativos e déficits cognitivos, visto que estes sintomas são difíceis de tratar. Todavia, o tratamento com ambos, típicos, bem como antipsicóticos atípicos, apresentam sérios efeitos colaterais levando a significativa perda de qualidade de vida no paciente esquizofrênico. Desse modo, considera-se fundamental o desenvolvimento de alternativas ou estratégias terapêuticas adjuvantes que possam intensificar a ação dos antipsicóticos e reduzir seus efeitos colaterais (Arvindakshan et al., 2003b).

Morrison et al. (2004), McGorry et al.(2008) e Amminger et al.(2010) evidenciam que os ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa ômega-3, podem reduzir os sintomas da esquizofrenia por suas propriedades neuroprotetoras, sem entretanto, apresentar efeitos adversos clinicamente relevantes. Nesse contexto, os ácidos graxos parecem ser uma boa estratégia na prevenção da psicose em indivíduos jovens que apresentam risco aumentado da doença.

1.2 MARCADORES INFLAMATÓRIOS

Estudos apontam que a esquizofrenia está associada a níveis aumentados de alguns marcadores inflamatórios, sugerindo a hipótese de que este transtorno é fundamentalmente uma doença inflamatória (Peet, 2006).

Meisenzahl et al. (2001) descreveram a relação entre a perda de volume cerebral e a maior produção de marcadores imunológicos IL-1 (interleucina 1). De forma similar, as mudanças morfológicas do volume cerebral e os níveis aumentados de IL-6 no CSF (fluido cérebroespinal)

na esquizofrenia foram apresentados por Garver et al. (2003) e Müller e Schwarz (2010). Além disso, esses estudos sustentam a hipótese de que a redução do volume cerebral ocorre devido ao desequilíbrio do neurodesenvolvimento mental e precede o primeiro episódio do transtorno. Nesse contexto, sabe-se que a progressiva perda deste volume, inclusive de massa cinzenta, persiste no curso do transtorno, especialmente em pacientes com quadro clínico avançado (Müller e Schwarz, 2010).

Recentemente Kronig et al. (2005) demonstraram que pacientes esquizofrênicos apresentam também níveis reduzidos de ICAM-1 (molécula solúvel de adesão inter celular 1) e que a expressão desta molécula em relação aos diferentes alelos do gene ICAM-1 mostrou-se anormal nestes pacientes quando comparados a indivíduos saudáveis. Pesquisas realizadas por Müller et al. (1999) e Schwarz et al. (2000) respectivamente, demonstram que a terapia com neurolépticos induziu aumento significativo de ICAM-1.

Entende-se que o tratamento com anti-inflamatórios propicia benefícios a pacientes esquizofrênicos, sendo esta uma estratégia terapêutica adjuvante (Hanson e Gottesman, 2005). Segundo Peet e Stokes (2005) essa terapia deve ser associada aos ácidos graxos ômega-3 e inibidores da enzima ciclo-oxigenase 2 (COX-2).

Müller e Schwarz (2010) em pesquisas recentes realizadas em animais observaram que a inibição da COX-2 é capaz de diminuir o aumento das citocinas próinflamatórias IL-1_B, TNF-alfa e PGE₂ (prostaglandina 2), podendo evitar sintomas clínicos como ansiedade e declínio cognitivo, ambos associados ao aumento destas citocinas. Sabe-se que, na esquizofrenia, a inibição da COX-2 mostrou efeitos benéficos preferencialmente em estágios precoces do transtorno e o seu efeito na doença crônica ainda é controverso (Müller e Schwarz, 2010). Apesar de o processo inflamatório estar envolvido na fisiopatologia da esquizofrenia, não se pode afirmar que uma intervenção em curto prazo com inibidor de COX-2, por 5 ou 6 semanas, reverteria um processo inflamatório crônico que predomina há anos (Müller e Schwarz, 2010).

Além do efeito anti-inflamatório do inibidor de COX-2, a inibição da COX provoca diferentes efeitos no metabolismo da KYA (cinurenina), principal produto da degradação do triptofano. O KYNA (ácido cinurênico) é o único ácido endógeno que age como receptor antagonista do NMDA no SNC em humanos (Müller e Schwarz, 2010). Sendo assim, enquanto a inibição da COX-1 aumenta os níveis de KYNA, a inibição da COX-2 apresenta efeito contrário (Schwieler et

al., 2005).

Portanto, evidências crescentes confirmam o papel das citocinas pro inflamatórias na fisiopatologia da esquizofrenia e a forte influência das citocinas pro e anti-inflamatórias no metabolismo do triptofano-cinurenina. A influência das citocinas sobre o neurotransmissor glutamatérgico, os resultados de estudos em imagem e o efeito terapêutico de drogas anti-inflamatórias indicam que a inflamação está em foco nas pesquisas atuais relacionadas à esquizofrenia (Müller e Schwarz, 2010). Entretanto, mais estudos são necessários para esclarecer o papel do sistema imune neste transtorno.

1.3. FATOR NEUOTRÓFICO DERIVADO DO CÉREBRO (BDNF)

O BDNF constitui um polipeptídeo de 27 Kda, importante membro da família das neurotrofinas, presente em grandes concentrações no cérebro e na periferia (Hashimoto et al., 2004) incluindo o hipocampo e o córtex cerebral (Nakazato et al., 2003). Vários dos seus efeitos são conhecidos no SNC onde salientamos: diferenciação, sobrevivência, crescimento e reparo neuronal. O BDNF é um fator importante na plasticidade dos sistemas dopaminérgico, serotoninérgico, colinérgico e glutamatérgico (Meredith et al., 2002; Casolini et al., 2004).

Níveis elevados de BDNF têm sido detectados em plaquetas de sangue humano, sugerindo que as plaquetas humanas podem fornecer uma importante fonte de BDNF para regeneração dos neurônios sensitivos periféricos no local onde ocorre a lesão do nervo (Yamamoto e Gurney, 1990; Radka et al., 1996). Assim, foi demonstrado que o BDNF atravessa a barreira hematoencefálica, sugerindo que os níveis séricos podem refletir os níveis de BDNF no cérebro e podem em parte, participar no desenvolvimento neuronal e manutenção cerebral (Nakazato et al., 2003).

Atualmente existe um crescente reconhecimento de que a fisiopatologia da esquizofrenia pode ser resultado de uma desregulação na plasticidade sináptica, com alterações nas neurotrofinas. O fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) é a neurotrofina distribuída mais amplamente no SNC, é considerada uma proteína crucial na doença psiquiátrica. Assim, evidências de estudos experimentais apontam o papel da dieta e das interações sociais e familiares na regulação do BDNF (Gama et al., 2012).

1.4 ESTRESSE OXIDATIVO

A baixa qualidade de vida em pacientes com esquizofrenia (Cardoso et al., 2005) tem forte relação com distúrbios relacionados à alimentação inadequada. Problemas como obesidade, dislipidemia, diabetes e síndrome metabólica, além de prejudicarem o funcionamento psicossocial, também estão associados à aceleração de processos biológicos como a excessiva produção de radicais livres, que gera uma condição denominada estresse oxidativo (Garcia-Alonso et al., 2004).

A partir da ideia de que o tecido cerebral é, em especial, suscetível ao ataque de EROs (Halliwell, 2006), evidências sugerem que o estresse oxidativo contribui para a fisiopatologia da esquizofrenia (Pazvantoglu et al., 2009; Zhang et al., 2009). O estresse oxidativo produz efeitos deletérios como a indução da peroxidação lipídica nas membranas, proteínas e genes (Mahadik et al., 2001) que por sua vez está associada a complicações nos sintomas positivos e negativos da doença. Neste contexto, antioxidantes podem reduzir os sintomas de depressão, melhorar as funções cognitivas e a qualidade de vida (Volchegorskii e Mester, 2007) influenciando de forma favorável o bem estar social e funcional (Verde, 2007), o que é muito promissor como adjuvante no tratamento de doenças psiquiátricas. Além disso, evidências sugerem que a suplementação dietética com ácidos graxos ômega-3 pode ser benéfica em diversas desordens psiquiátricas. No entanto, entende-se que são necessárias pesquisas que avaliem a suplementação de ômega-3 em indivíduos com probabilidade de desenvolver esquizofrenia e a sua associação com as defesas de antioxidantes, bem como o efeito da suplementação nutricional nesta área.

A teoria do estresse oxidativo como um mecanismo fisiopatológico, pode ser explicada pelo conceito do paradoxo do oxigênio, uma vez que, da mesma forma que o oxigênio é necessário para manter a vida aeróbica, quantidades excessivas de radicais livres podem produzir subprodutos tóxicos (Davies, 2000). Halliwell (2006) define estresse oxidativo como um desequilíbrio entre a produção de EROs e a capacidade de defesa antioxidante do organismo.

Entende-se que níveis reduzidos de enzimas antioxidantes, superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GSH-Px), bem como da capacidade antioxidante total tem sido documentada nos pacientes com esquizofrenia quando comparado a controles saudáveis (Yao et al., 1998; Ranjekar et al., 2003; Zhang et

al., 2006; Ng et al., 2008; Othmen et al., 2008). Elevados níveis de TBARS tem sido encontrados no plasma, eritrócitos, leucócitos e plaquetas de pacientes esquizofrênicos, juntamente com anormalidades nos níveis de enzimas antioxidantes e depleção dos PUFA's (ácido graxo poli-insaturado), que são particularmente propensos à peroxidação lipídica (Ng et al., 2008; Othmen et al. 2008).

Suportando a hipótese acima, uma pesquisa realizada em um modelo animal de esquizofrenia induzido por cetamina mostrou que houve um aumento na peroxidação lipídica, no dano protéico e uma diminuição das enzimas antioxidantes CAT e SOD (De Oliveira et al., 2009). Em conformidade a esses dados, Radonjic et al. (2008) também verificou que a atividade destas enzimas antioxidantes foi alterada em algumas áreas cerebrais no mesmo modelo animal de esquizofrenia induzido por cetamina.

1.5 SISTEMA COLINÉRGICO

Em 1914, Dale investigou detalhadamente as propriedades farmacológicas da acetilcolina (ACh). Nesse estudo, foi possível observar a breve duração da ação da ACh e foi proposto que uma esterase dos tecidos degradaria rapidamente a ACh em ácido acético e colina, interrompendo desta forma sua ação (Rang et al., 2004). A esterase em questão é a acetilcolinesterase (AChE), uma glicoproteína globular encontrada nos neurônios colinérgicos, nas proximidades das sinapses colinérgicas e em concentrações elevadas na junção neuromuscular (Massoulé et al., 1996). A hidrólise do neurotransmissor ACh pela AChE no SNC é conhecida por ser uma das reações catalíticas enzimáticas mais eficientes (García-Ayllón et al., 2011).

A ACh é um neurotransmissor excitatório sintetizado no neurônio pré-sináptico pela colina acetiltransferase, a partir da colina e acetil-coenzima A. Atua ligando-se aos receptores muscarínicos ou nicotínicos localizados na membrana pré e pós-sináptica. Este neurotransmissor apresenta papel fundamental nas funções motora, cognitivas e de memória. Em pacientes esquizofrênicos, as disfunções cognitivas são frequentemente encontradas e relacionam-se a alterações com o sistema colinérgico (Voss et al., 2008).

A supressão da quantidade de ACh provoca a perda massiva da capacidade de ação do SNC. Além disso, a diminuição na concentração da ACh está relacionada diretamente com o déficit cognitivo, característica marcante em pacientes acometidos pela esquizofrenia

(Sugimoto et al., 2002).

Estudos epidemiológicos e laboratoriais sugerem um efeito protetor da dieta rica em peixes e ácidos graxos, como por exemplo, ácido docosahexaenoico e ácido eicosapentenoico para a demência. Enquanto que, efeitos positivos sobre o peso e apetite foram demonstrados em um único estudo em pacientes com demência leve (Irving et al., 2009).

2 ÔMEGA-3 E A HIPÓTESE FOSFOLIPÍDICA

Nos anos 20, dois pesquisadores depois de observarem alguns sinais e sintomas em pessoas que tinham restrição de gordura na sua dieta, confirmaram que havia compostos essenciais para a saúde do organismo (Burr, 1981). Desde então os ácidos graxos essenciais têm sido estudados, embora com maior interesse apenas na década de 70.

O Ômega-6 e Ômega-3 são ácidos graxos com duplas ligações nos carbonos ômega, sendo essenciais ao bom funcionamento do organismo de mamíferos, incluindo os seres humanos, contudo não podem ser sintetizados endogenamente, ou seja, devem estar presentes na alimentação para que possam ser utilizados pelos tecidos corporais. Neste contexto destacamos os ácidos linoleicos (LA 18:2 ômega-6) e α -linoleico (ALA 18:3 ômega-3), que pela ação das enzimas do fígado dão origem a ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (LC-PUFAS), composto que tem um importante papel no processo inflamatório e de defesa do organismo (Haag, 2003).

O ácido graxo α -linoleico (ALA 18:3 ômega-3), somente foi reconhecido como nutriente essencial há poucas décadas (Heird e Lapillonne, 2005). Ele está presente em óleos vegetais como linhaça, canola e soja. Deste ácido graxo derivam os ácidos eucosapentaenoico (EPA 20:5 ômega-3) e docosaexaenoico (DHA 22:6 ômega-3). Estes PUFAs estão presentes nos óleos de peixe como salmão, sardinha, atum e cavalinha e compõem os fosfolipídios de membrana e desempenham papéis diferentes no organismo (Marszalek e Lodish, 2005). Entende-se que depois do tecido adiposo, o SNC possui o maior conteúdo de lipídios do corpo humano, e 35% dos lipídios de um encéfalo adulto são ácidos graxos poli-insaturados (Haag, 2003).

Os PUFAs atuam na sinalização celular, regulação enzimática, síntese de eicosanoides, regulação da migração neuronal, determinação da plasticidade sináptica e modulação de citocinas (Horribin, 1998; Burger et al. 2002). Isso indica possivelmente que os PUFAs estejam envolvidos na fisiopatologia de alguns transtornos psiquiátricos como a esquizofrenia e a depressão (Lackhan e Viera, 2008).

Existem poucos estudos que relacionam o sistema glutamatérgico com os ácidos graxos ômega3, principalmente o DHA. Estudos recentes evidenciam que, uma dieta enriquecida em ômega-3 foi capaz de reverter o decréscimo da atividade de subunidades de receptores NMDA

e AMPA que ocorre em animais envelhecidos (Dyall et al., 2006). Ainda foi demonstrado que o DHA pode modular o transporte de glutamato de maneira dose-dependente e em situações de dano cerebral (Grntal et al., 2009; Moreira et al., 2010). Foi demonstrado que o DHA pode ser liberado das membranas celulares mediante a ativação da enzima fofolipase A2(PLA2) quando em situações de dano neural, dando origem a um composto denominado neuroprotectina D1 um docosanoide que exerce um papel neuroprotetor no SNC (Lukiw e Bazan, 2008; Bazan, 2006; Bazan et al., 2005).

A deficiência dietética e os baixos níveis endógenos de ácidos graxos ômega-3 tem sido associados a um pior diagnóstico de doenças psiquiátricas, e alguns estudos clínicos têm demonstrado que a suplementação destes ácidos graxos foi benéfica em pacientes com depressão, transtorno bipolar e esquizofrenia (Peet e Stokes, 2005).

Um recente estudo realizado concluiu que o ômega-3 reduz o risco de progressão do transtorno psicótico e pode ser uma estratégia eficiente e segura de prevenção em pessoas jovens com prévios estados psicóticos. Além destas vantagens, os autores observaram excelente tolerabilidade e melhor aceitação do suplemento pelos pacientes quando comparado a medicamentos tradicionais, além do custo relativamente baixo do ômega-3 e seus efeitos gerais benéficos a saúde. (Amminger et al., 2010). Um estudo realizado pelo nosso grupo de pesquisa evidenciou o efeito preventivo dos sintomas positivos e negativos do Ômega-3 em um modelo animal de esquizofrenia induzido por cetamina (Gama, et al., 2012).

2.1 MODELO ANIMAL DE ESQUIZOFRENIA E CETAMINA

O modelo animal de esquizofrenia pode ser induzido por drogas como anfetamina, cetamina e fenciclidina, as quais simulam manifestações comportamentais em animais semelhantes aos sintomas da esquizofrenia em humanos (Angrist et al., 1974; Hetem et al., 2000). Tais sinais incluem quatro dimensões principais: hiperlocomção, estereotipia, deficiência no processamento de informações, comprometimento das funções cognitivas (memória de trabalho e atenção) e interação social prejudicada (Bubenikova Valesova, et al., 2008).

O cloridrato de cetamina referenciado como uma droga dissociativa é usada para fins de anestesia com efeito hipnótico e características analgésicas (Vasconcelos et al., 2005). Provoca perda

sensorial marcante, analgesia e paralisia do movimento, assim como amnésia sem perda real da consciência (Rang et al., 2004; Morgan et al., 2004). A cetamina age como antagonista não competitivo do receptor glutamatérgico NMDA, encontrado especialmente nas regiões do hipocampo e córtex cerebral – áreas cruciais para os processos de memória e cognição humanos (Morgan et al., 2004).

O modelo animal induzido por cetamina pode ser considerado mais completo por sua capacidade em mimetizar os sintomas negativos e cognitivos do transtorno (validade de face), já tendo sido relatada sua validade de constructo (Becker et al., 2003) e validade preditiva (Becker e Grecksh, 2004). Os estudos também confirmam que o modelo de cetamina fornece um novo olhar para ambas as teorias de transmissão glutamatérgica e dopaminérgica da esquizofrenia (Vollenweider et al., 2000). Considerando esses achados, utilizaremos a cetamina em doses sub-anestésicas no presente estudo, visando mimetizar os comportamentos do transtorno no animal escolhido para ser o modelo.

A esquizofrenia é um transtorno de etiologia multifatorial e fisiopatologia complexa, o que representa um grande desafio para comunidade médica e científica. O tratamento farmacológico apresenta resultados positivos, contudo a ampla incidência de efeitos colaterais associados limita a eficácia. Portanto, estudos que possam identificar estratégias adjuvantes ao tratamento são de extrema relevância para essa população. Da mesma forma, a identificação de marcadores bioquímicos associados a essas novas estratégias contribui para trazer à luz novos conhecimentos acerca da fisiopatologia da doença. Nesse contexto, este trabalho se propôs a avaliar o efeito preventivo do ômega-3 sobre o comportamento e parâmetros bioquímicos de animais submetidos ao modelo animal de esquizofrenia induzido por cetamina.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Testar a hipótese de que o ácido graxo poli-insaturado ômega-3 previne alterações comportamentais e bioquímicas em animais submetidos ao modelo animal de esquizofrenia induzido por cetamina.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Verificar o efeito preventivo do Ômega-3 sobre:

- A porcentagem de inibição por pré-pulso em ratos jovens submetidos ao modelo animal de esquizofrenia induzido por cetamina;
- Parâmetros de estresse oxidativo (dano em lipídios, proteínas e atividade de enzimas antioxidantes) em tecidos cerebrais de ratos jovens submetidos ao modelo animal de esquizofrenia induzido por cetamina;
- Atividade da acetilcolinesterase (AChE) em tecidos cerebrais de ratos jovens submetidos ao modelo animal de esquizofrenia induzido por cetamina;
- Os níveis de interleucinas pró-inflamatórias em tecidos cerebrais de ratos jovens submetidos ao modelo animal de esquizofrenia induzido por cetamina;
- Os níveis de BDNF em tecidos cerebrais de ratos jovens submetidos ao modelo animal de esquizofrenia induzido por cetamina.

3.3 HIPÓTESES

A suplementação de ácido graxo poli-insaturado ômega-3 previne alterações comportamentais e bioquímicas em modelo animal de esquizofrenia induzido por cetamina.

4 METODOLOGIA

4.1. ASPECTOS ÉTICOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Neurociências da Universidade do Extremo Sul Catarinense. Todos os procedimentos experimentais foram realizados conforme as recomendações internacionais para o cuidado e o uso de animais de laboratório, considerando também as recomendações para o uso de animais da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento (SBNec). Este projeto foi aprovado em Abril de 2012 pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEUA) da Universidade do Extremo Sul Catarinense com o protocolo nº 14/2012.

4.2. ANIMAIS EXPERIMENTAIS

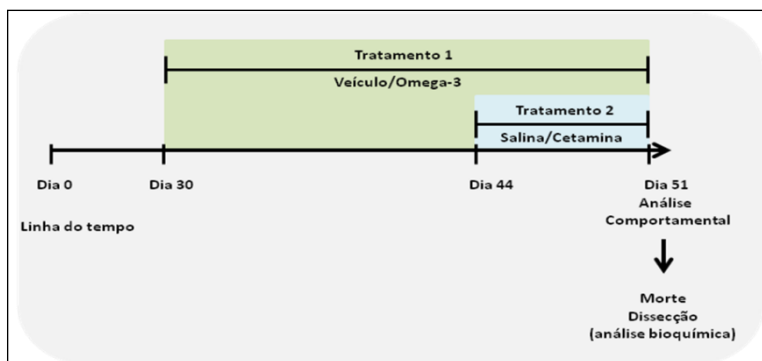
Foram utilizados neste estudo 144 ratos Wistar machos jovens (28 a 30 dias) pesando entre 80g e 150g, procedentes do Biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense. Os ratos foram acondicionados em 5 animais por caixa e mantidos em ambiente climatizado (22°C) com ciclos claro-escuro de 12 horas, água e alimentação padrão livre.

Primeiramente os animais foram divididos em dois grupos de 24 ratos, os quais receberam suplementação de ômega-3 ou veículo durante 21 dias. Entre o décimo quinto dia e vigésimo primeiro dia de suplementação com ômega-3, os animais foram novamente divididos em quatro grupos de 12 ratos para o tratamento concomitante com salina ou cetamina durante 7 dias. Ao final, os seguintes grupos foram formados: **Veículo+salina,** **Ômega+salina,** **Veículo+cetamina,** **Ômega+cetamina.** Os animais utilizados no estudo foram separados randomicamente em grupos e todos os ratos, sem exceção, foram utilizados nos experimentos. A Figura 3 ilustra o desenho experimental descrito acima.

Após a aplicação das duas intervenções, os animais foram submetidos ao teste de inibição por prepulso. Em seguida, os animais foram mortos por decapitação em guilhotina e as estruturas cerebrais (estriado, hipocampo e córtex pré-frontal.) foram dissecadas, congeladas em nitrogênio líquido e mantidas em freezer -80°C para análises bioquímicas posteriores. As análises englobaram testes como: atividade dos complexos da cadeia respiratória, atividade e expressão da enzima

acetilcolinesterase e da creatina cinase, parâmetros de dano oxidativo, atividade de enzimas antioxidantes, níveis de BDNF e interleucinas. Uma amostra de 5 animais por grupo foi utilizada para os testes bioquímicos: cadeia respiratória e atividade da creatina cinase, totalizando 20 animais. Para as análises de dano oxidativo e atividade de enzimas antioxidantes foram utilizada uma amostra de 7 animais por grupo, no total, 28 ratos.

Figura 3- Desenho Experimental



Fonte: Dados da pesquisa

As carcaças dos animais foram acondicionadas em saco branco leitoso e encaminhadas para freezer (conservação) na universidade. Após conservação, foram coletadas e transportadas por empresa terceirizada. Os resíduos foram tratados fisicamente e em seguida encaminhados para disposição final em aterro sanitário. Todos esses procedimentos estão em conformidade com a RDC nº 306/2004 da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária).

4.3 SUPLEMENTAÇÃO DOS ANIMAIS COM ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADO ÔMEGA-3

O ácido graxo poli-insaturado ômega-3 foi administrado através de gavagem orogástrica uma vez ao dia na dose de 0,8g/kg, durante os 21 dias de experimento. O tratamento foi iniciado em animais jovens (30 dias de idade) e prosseguiu até a fase adulta, totalizando um período de 21 dias de suplementação.

As cápsulas de ômega-3 foram compostas por 1200mg de óleo de

peixe, importante fonte deste ácido graxo poli-insaturado. Também foram constituídas por ácido graxo poli-insaturado EPA (ácido eicosapentaenoico - 18%) e DHA (ácido docosaexaenoico – 12%).

4.4 CETAMINA

A cetamina, administrada por via intraperitoneal, foi utilizada na dose de 25 mg/kg, preparada em solução salina no volume de 1 mL/100g (Becker e Grecksh, 2004; Imre et al., 2006; Tomiya et al., 2006). 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 de cetamina e suplementar com ômega-3 foi verificar se este ácido graxo atua na prevenção dos comportamentos semelhantes à esquizofrenia induzidos pela cetamina em animais.

4.5 TESTE COMPORTAMENTAL E ANÁLISES BIOQUÍMICAS

4.5.1 Teste de Inibição por prepulso

Este teste funciona como uma medida operacional do filtro sensorio motor refletido pela capacidade de inibição de um reflexo de sobressalto, induzido por um estímulo sensorial (auditivo, visual ou tátil) de maior intensidade, precedido por um estímulo de menor intensidade (Hoffmann e Ison, 1980). Esse comportamento é uma resposta natural de defesa, ocorrendo em resposta a um estímulo intenso e inesperado e pode ser observado em diferentes espécies de mamíferos (humanos, primatas e roedores). Contudo, o mecanismo de inibição por prepulso parece estar prejudicado em pacientes psiquiátricos (Geyer et al., 2001).

A quantificação da inibição promovida por um prepulso após a resposta ao pulso foi realizada com base em um estudo realizado anteriormente (Kinhead et al., 2006). Caixas com isolamento acústico foram utilizadas para medir o sobressalto (insight® - EP 175). Em primeiro lugar, os animais mantiveram-se durante um período de 5 minutos de habituação nestas caixas. Depois disso, 10 pulsos foram aplicados para a habituação dos animais (este número não foi considerado para os cálculos). Durante a sessão, foram apresentados três tipos de estímulos 10 vezes e distribuídos aleatoriamente em intervalos de 20 segundos: 1) pulsos de 120 dB para 40 ms (capaz de produzir uma

resposta de susto), 2) um prepulso de 65, 70 ou 75 dB durante 20 ms aplicado 80 ms antes do pulso, 3) ausência de estímulo. A média de amplitude de sobressalto após as sessões de pulso (P), bem como a amplitude média de sessões de resposta de sobressalto após o prepulso e pulso (PP) foram calculadas para cada animal. A porcentagem de inibição promovida pelo prepulso de resposta de sobressalto induzida por pulso foi calculada de acordo com a seguinte equação: inibição de prepulso (%) = $100 - [(PP / D) \times 100]$.

4.5.2 O dano oxidativo a lipídios e proteínas

Os efeitos da cetamina e/ou ômega-3 sobre de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foram medidas em estruturas cerebrais para verificar dano oxidativo. Conforme descrito (Draper e Hadley, 1990), as amostras de estriado, córtex pré-frontal e hipocampo foram misturadas em ácido tricloroacético 1ml de 10% e 1 ml de ácido tiobarbitúrico a 0,67%, e, em seguida, aquecidas durante 30 minutos. Os equivalentes de malondialdeído (MDA) foram determinados espectrofotometricamente usando a absorbância a 532nm.

A determinação de grupos carbonil baseados na reação com dinitrofenilhidrazina (DNPH), foi realizada para avaliar os danos á proteínas. Este protocolo foi anteriormente descrito por Levine et al. (1994). Resumidamente, as proteínas foram precipitadas por adição de ácido tricloroacético a 20% e foram redissolvidas em DNPH. A absorbância foi monitorada espectrofotometricamente a 370 nm.

4.5.3 Atividade de enzimas antioxidantes

A atividade da SOD foi definida como a capacidade de autooxidação do pirogalol, um processo altamente dependente de O_2^{-2} , um substrato para a SOD (Bannister e Calabrese, 1987). Em resumo, a presença de SOD influencia a inibição da autooxidação do pirogalol, assim, a atividade da enzima pode ser indiretamente testada. A quantificação da atividade da enzima foi realizada em espectrofotômetro (420nm). Além disso, a curva de calibração da SOD foi definida pela SOD purificada. Os valores de atividade de SOD foram expressos como unidades por mg de proteína e uma unidade da enzima SOD é definida quando existe uma autooxidação do pirogalol 50%.

Para a análise de CAT, o protocolo de Laemmli (1970) foi aplicado usando o espectrofotômetro a 240 nm. O método baseia-se no

desaparecimento de H_2O_2 , meio de reação contendo 20 mM de H_2O_2 , 0,1% de Triton X-100, 10 mM de potássio tampão de fosfato, pH 7,0, 0,1 e 0,3 mg-proteína/ml. Uma unidade de CAT foi definida como 1mol de H_2O_2 consumido por minuto.

A atividade enzimática da GPx foi medida utilizando hidroperóxido de terc-butila, o substrato de acordo com o protocolo descrito anteriormente (Wendel, 1981). A atividade da enzima foi medida por monitorização da velocidade de desaparecimento de NADPH a 340 nm, em tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0, contendo EDTA 1,0 mM, 2,0 mM glutationa (GSH), 0,2 U/mL de GSH redutase, azida 1,0 mM, 0,2 mM terc-butil hidroxi-peróxido, NADPH 0,2 mM, e o sobrenadante contendo 0,2-0,3 mg de proteína/mL. A unidade de atividade da GPx foi expressa como nmol de NADPH oxidada por minuto por mg de proteína, utilizando um coeficiente de extinção de $6,22 \times 10^6$ para NADPH.

Todas as medidas relacionadas com a atividade das enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GPx) foram normalizadas usando os valores de proteína total (albumina de soro bovino) a partir das amostras, tal como descrito por Lowry et al. (1951).

4.5.4 Avaliação da atividade da enzima acetilcolinesterase (ACHE)

A avaliação da atividade da enzima AChE foi realizada com base no método descrito por Ellman e colaboradores (1961), onde foi avaliada a hidrólise da ACh numa concentração de 0,8 mM em 1 ml de uma solução contendo 100 mM de tampão fosfato (pH 7,5) e 1,0 mM de DTNB. Cinquenta microlitros de amostra foram adicionadas à solução e pré-incubadas por 3 min. A hidrólise foi monitorada pela formação do diânion tiolato de DTNB a 412 nm por 2-3 min. em intervalos de 30 s a 25°C. As amostras foram avaliadas em duplicatas.

4.5.5 Análise da expressão gênica de AChE (RT-PCR)

Análise da expressão gênica foi realizada apenas quando a alteração cinética ocorreu. O RNA total foi isolado com o reagente Trizol® (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA), em conformidade com as instruções do fabricante. O RNA total foi quantificado por espectrofotometria e o cDNA foi sintetizado com ImProm-II™, sistema de transcrição reversa (PrÔmega) a partir de 1 µg de ARN total, seguindo as instruções do fabricante. O PCR quantitativo foi realizado utilizando

SYBR® Green I (Invitrogen), para detectar a síntese de cDNA de cadeia dupla. As reações foram realizadas num volume de 25 uL utilizando 12,5mL de cDNA diluído (1:50 em HPRT1, Rlp 13 Aedor), contendo uma concentração final de 5M de betaína (Sigma-Aldrich), de 0,2x®SYBRGreen I (Invitrogen), 100uM de dNTP, 1x tampão de PCR, MgCl₂ 3 mM, 0,25 U Platinum® TaqDNA polimerase (Invitrogen) e 200nM de cada um para a frente e reverso iniciadores (Tabela 1). As condições de PCR de ciclagem foram: um passo de ativação inicial da polimerase durante 5 min a 95 ° C, 40 ciclos de 15s a 95°C para a desnaturação, 35s a 60°C para reconhecimento e 15 segundos a 72°C para alongamento. No final do protocolo, uma análise da curva de fusão foi medida a 60-99°C. Níveis de expressão relativa foram determinados com tempo real pelo sistema de detecção de sequência por meio de um Software 2.0.5 (Biosystems software). A eficiência de cada amostra foi calculada usando o software LinReg PCR 11,0 e a estabilidade dos genes de referência: HPRT1 e Rlp13A (M-valor) e o número ótimo de genes de referência de acordo com a variação (V) foram analisadas pelo “GeNorm 3.5 Software” (<http://medgen.ugent.be/genorm/>). Níveis relativos de expressão de ARN foram determinados usando o método 2- $\Delta\Delta CT$.

Tabela 1. PCR Desenho inicial

Enzima	Sequencia inicial (5'-3')	Banco do Gen numero de acesso (mRNA)	Ampliação Tamanho
<i>Hprt1</i> *	F – GCAGACTTTGCTTTCCTTGG R – CGAGAGGTCCTTTTCAACCAG	NM_012583	81
<i>Rpl13A</i> *	F – ACAAGAAAAAGCGGATGGTG R – TTCCGGTAATGGATCTTTGC	NM_173340	167
<i>ache</i> **	F – CTGGACCAATTTGCCCGCAC R – CGATTCCAGAAGGCGCAGGTCTG	BC094521.1	165

* De acordo com Bonefeld et al. (2008)

** Descrito pelos autores.

4.5.6 Determinação de Interleucinas e BDNF

Os níveis de BDNF e interleucinas (IL1 β , IL6) no córtex pré-frontal, hipocampo e estriado foram medidos por ELISA sanduíche, de acordo com as instruções do fabricante (Chemicon, EUA para BDNF e Millipore, EUA e Canadá para NGF). Resumidamente, as estruturas cerebrais foram homogeneizadas numa solução de tampão fosfato (PBS)

com um coquetel inibidor de protease (Sigma). As placas de microtitulação (de 96 poços de fundo plano) foram revestidas durante 24 horas com as amostras diluídas 1:2 em diluente da amostra com a curva padrão variando de 7,8 a 500 pg/ml de BDNF e ILs. As placas foram então lavadas com a amostra diluente em anticorpo monoclonal específico para cada proteína (BDNF ou IL1 β ou IL6) num total de quatro vezes. Depois da lavagem, um anticorpo secundário conjugado a peroxidase foi adicionado a cada poço e incubou-se à temperatura ambiente durante 1 hora. Após a adição da enzima estreptavidina, a quantidade de BDNF e interleucinas foi determinada por absorbância a 450 nm. A curva padrão demonstra uma relação direta entre a densidade óptica (OD) e a concentração. A quantidade de proteínas totais foi medida utilizando albumina bovina como um padrão, tal como foi previamente descrito por Lowry et al.(1951).

Ressalta-se que a resposta pró-inflamatória é observada tardiamente em modelos semelhantes (Strous et al., 2006). Em contraste, alterações nos níveis de BDNF são observadas tanto logo após as intervenções como tardiamente (Réus et al., 2011). Desta forma, optamos por avaliar os níveis de interleucinas 24 horas após a morte e os níveis de BDNF tanto 1 hora como 24 horas após a morte.

5 RESULTADOS

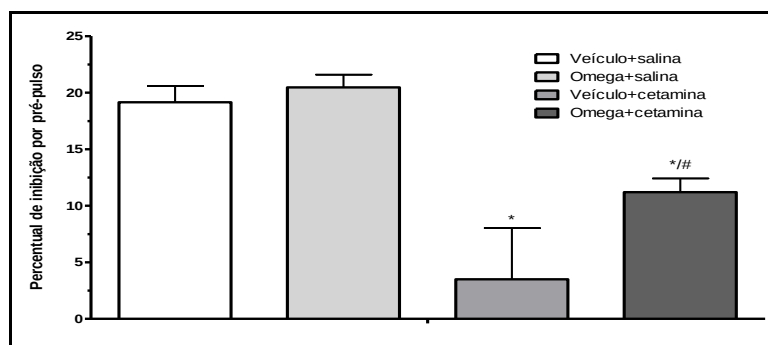
A presente pesquisa testou a hipótese de que o ácido graxo poli-insaturado ômega-3 previne alterações comportamentais e bioquímicas em animais submetidos ao modelo animal de esquizofrenia induzido por cetamina.

5.1 A PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO POR PREPULSO E DANO OXIDATIVO EM RATOS JOVENS SUPLEMENTADOS COM ÔMEGA-3 E SUBMETIDOS AO MODELO ANIMAL DE ESQUIZOFRENIA INDUZIDO POR CETAMINA

5.1.1 Análise comportamental

A figura 4 traz os resultados de inibição por prepulso. Os resultados indicam que a administração de cetamina na dose de 25mg/kg em modelos animais induz comportamento semelhante ao estado psicótico em humanos e verificou-se que essas mudanças podem ser prevenidas pela suplementação com ômega-3. Um efeito significativo de cetamina foi revelado pela a ANOVA de duas vias [$F(1,24) = 24,45$, $p < 0,01$], enquanto que não foi observada interação entre as variáveis categóricas.

Figura 4- Porcentagem de inibição por pré-pulso



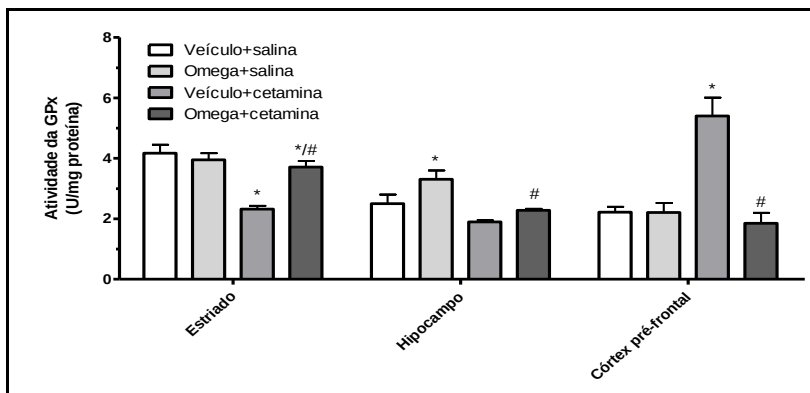
Efeito da suplementação de ômega-3 e/ou tratamento com cetamina (25mg / kg) sobre a percentagem de inibição de pré-pulso em diferentes estruturas cerebrais de ratos. Os dados são expressos como média±EPM de cinco animais em cada

grupo. * diferente de Veículo+salina, # diferente de Veículo+cetamina. (Barra branca= Veículo+salina; barra cinza claro= Ômega+salina; barra cinza médio= Veículo+cetamina e barra cinza escuro= Ômega+cetamina).

5.1.2 Atividade de enzimas antioxidantes

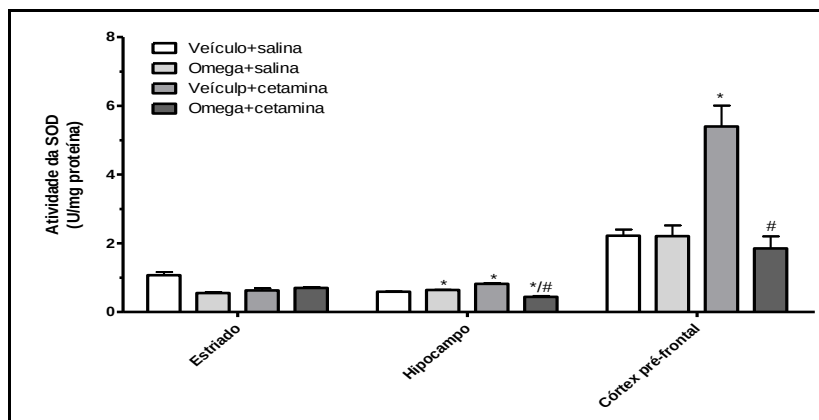
A atividade das enzimas antioxidantes (GPx, SOD e CAT) nas estruturas estudadas são demonstradas nas Figuras 5, 6 e 7, respectivamente. No estriado, a cetamina diminuiu a atividade da GPx, enquanto a combinação de cetamina e ômega-3 promoveu o aumento no mesmo parâmetro. No entanto, o aumento observado no grupo Ômega+cetamina foi inferior ao do grupo controle, o que demonstra que o Ômega-3 não foi capaz de reverter totalmente a diminuição de GPx. A ANOVA de duas vias indicou haver efeitos significativos de cetamina [$F(1,20) = 18,5$, $p < 0,01$], Ômega-3 [$F(1,20) = 8,7$, $p < 0,01$] e da interação entre as variáveis [$F(1,20) = 5,6$, $p < 0,05$].

No hipocampo, um efeito benéfico do ômega-3 em promover aumento da atividade da GPx foi revertido pela cetamina. A ANOVA de duas vias demonstra haver um forte efeito da cetamina [$F(1,20) = 14,65$, $p < 0,01$] e ômega-3 [$F(1,20) = 7,6$, $p < 0,05$]. No córtex pré-frontal, o grupo que recebeu cetamina apresentou maiores níveis de GPx relacionadas ao grupo controle, enquanto a combinação de Ômega+cetamina impediu esse aumento. Um efeito da cetamina foi observado nesse parâmetro [$F(1,20) = 7$, $p < 0,05$]. Em geral, os dados da Figura 5 que observamos abaixo, indicam que os efeitos benéficos de ômega-3 são seletivos ao estriado e hipocampo.

Figura 5- Atividade da GPx

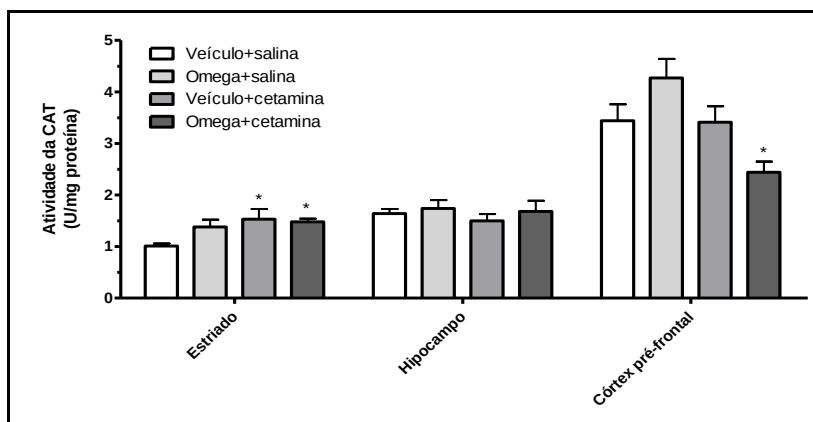
Efeito da suplementação de ômega-3 e/ou tratamento com cetamina (25mg/kg) sobre a atividade da GPx nas diferentes estruturas cerebrais de ratos. Os dados estão expressos como média±EPM de cinco animais em cada grupo. * diferente de Veículo+salina, # diferente de Veículo+cetamina. (Barras brancas= Veículo+salina; barras cinza claro= Ômega+salina; barras cinza médio= Veículo+cetamina e barras cinza escuro= Ômega+cetamina).

A Figura 6 ilustra os valores da atividade da SOD. Não foram observadas alterações na atividade da SOD no estríado. No entanto, os valores de SOD no hipocampo foram superiores no grupo que recebeu somente cetamina ou somente ômega-3. Em contrapartida, a combinação de variáveis induziu redução da atividade da SOD (Figura 6). A análise de duas vias indica que os valores foram influenciados pelo ômega-3 [$F(1,20) = 47,9$, $p < 0,01$] e pela interação entre cetamina e ômega-3 [$F(1,20) = 89,0$, $p < 0,01$]. No córtex pré-frontal, a atividade da SOD foi maior no grupo tratado com cetamina somente, enquanto níveis mais baixos foram observados no grupo que recebeu cetamina e ômega-3. As diferenças observadas foram resultado tanto do tratamento com cetamina [$F(1,20) = 12,2$, $p < 0,01$] como pela suplementação com ômega-3 [$F(1,20) = 20,9$, $p < 0,01$] e pela interação entre as variáveis [$F(1,20) = 25,7$, $p < 0,01$].

Figura 6- Atividade da SOD

Efeito da suplementação de ômega-3 e/ou tratamento com cetamina (25mg / kg) sobre a atividade da SOD em diferentes estruturas cerebrais de ratos. Os dados estão expressos como média $\pm$ EPM de cinco animais em cada grupo. * diferente de Veículo+salina, # diferente de Veículo+cetamina. (Barras brancas= Veículo+salina; barras cinza claro= Ômega+salina; barras cinza médio= Veículo+cetamina e barras cinza escuro= Ômega+cetamina).

A Figura 7 mostra os valores de atividade de CAT nas mesmas estruturas onde foram avaliadas a atividade da SOD e GPx. Não foram observadas alterações nos valores de CAT em tecido hipocampal. No estriado, o grupo que recebeu somente cetamina e o grupo tratado com cetamina e ômega-3 apresentaram maiores níveis de CAT. Diferente disto, no córtex pré-frontal apenas a combinação de cetamina e ômega-3 favoreceu a diminuição da atividade CAT. ANOVA de duas vias aponta para um efeito significativo da cetamina [$F(1,20) = 8,7$, $p < 0,01$] no estriado, enquanto no córtex, o efeito observado é um resultado da interação entre as variáveis [$F(1,20) = 5,89$, $p < 0,05$].

Figura 7- Atividade da CAT

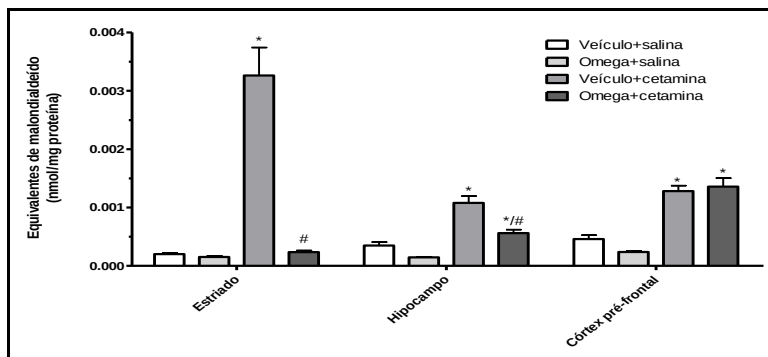
Efeito da suplementação de ômega-3 e/ou tratamento com cetamina (25mg / kg) sobre a atividade de CAT em diferentes estruturas cerebrais de ratos. Os dados estão expressos como média±EPM de cinco animais em cada grupo. * diferente de Veículo+salina, # diferente de Veículo+cetamina. (Barras brancas= Veículo+salina; barras cinza claro= Ômega+salina; barras cinza médio= Veículo+cetamina e barras cinza escuro= Ômega+cetamina).

5.1.3 Dano em lipídios e proteínas

Nas Figuras 8 e 9, os valores de TBARS e carbonilação de proteínas são demonstrados. Os valores de TBARS indicam que todos os grupos que receberam somente cetamina apresentaram maiores valores de TBARS no córtex pré-frontal, hipocampo e estriado. O grupo tratado com ômega+cetamina apresentou um efeito semelhante no córtex pré-frontal. Em contraste, o mesmo grupo mostrou uma diminuição deste parâmetro no hipocampo e estriado. A análise de duas vias indica que os efeitos no hipocampo resultaram da suplementação com ômega-3 [$F(1,16) = 25,68$, $p < 0,01$], a cetamina [$F(1,16) = 65,04$, $p < 0,01$], e também da interação de ambos os fatores [$F(1,16) = 4,96$, $p < 0,05$]. Estes efeitos foram semelhantes no estriado [$F(1,16) = 41,04$, $p < 0,01$, para o efeito de ômega-3, $F(1,16) = 42,87$, $p < 0,01$, para efeito da cetamina, $F(1,16) = 38,41$, $p < 0,01$, para a interação entre os fatores. Diferentemente, os valores de TBARS no córtex pré-frontal foram resultado da influência do tratamento com cetamina [$F(1,16) = 109,54$,

$p < 0,01$].

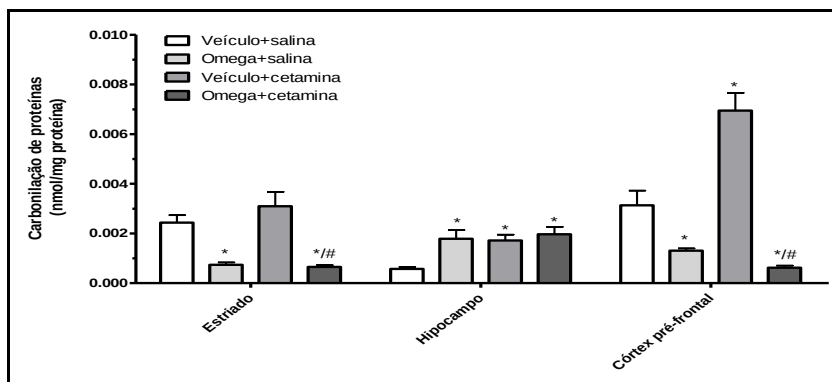
Figura 8- Equivalentes de malondialdeído



Efeito da suplementação de ômega-3 e / ou tratamento com cetamina (25mg / kg) ao longo de TBARS em diferentes estruturas cerebrais de ratos. Os dados estão expressos como média±EPM de cinco animais em cada grupo. * Diferente Veículo+salina, # diferente de Veículo+cetamina. (Barras brancas= Veículo+salina; barras cinza claro= Ômega+salina; barras cinza médio= Veículo+cetamina e barras cinza escuro= Ômega+cetamina).

Em relação à carbonilação de proteínas, todos os grupos experimentais mostraram aumento na carbonilação protéica no hipocampo, como resultado da suplementação com ômega-3 [F (1,16) = 7,76, $p < 0,05$] ou tratamento com cetamina [F (1,16) = 6,31, $p < 0,05$]. No córtex pré-frontal, o ômega-3 proporcionou uma redução da carbonilação, além de prevenir o aumento induzido pela cetamina. Os dados do córtex pré-frontal foram influenciados pelo ômega-3 [F (1,16) = 76,14, $p < 0,01$], a cetamina [F (1,16) = 11,18, $p < 0,01$] e pela interação entre os fatores [F (1,16) = 23,18, $p < 0,01$]. Os valores relacionados à carbonilação de proteínas no estriado foram dependentes da suplementação de ômega-3 [F (1,16) = 38,72, $p < 0,01$], assim como podemos observar na Figura 9.

Figura 9- Carbonilação de proteína



Efeito da suplementação de ômega-3 e/ou tratamento com cetamina (25mg/kg) sobre a carbonilação de proteínas em diferentes estruturas cerebrais de ratos. Os dados são expressos como média $\pm$ EPM de cinco animais em cada grupo. * Diferente de Veículo+salina, # diferente de Veículo+cetamina. (Barras brancas= Veículo+salina; barras cinza claro= Ômega+salina; barras cinza médio= Veículo+cetamina e barras cinza escuro= Ômega+cetamina).

5.2 ATIVIDADE E EXPRESSÃO GÊNICA DA AChE EM TECIDOS CEREBRAIS DE RATOS JOVENS SUPLEMENTADOS COM ÔMEGA-3 E SUBMETIDOS AO MODELO ANIMAL DE ESQUIZOFRENIA INDUZIDO POR CETAMINA

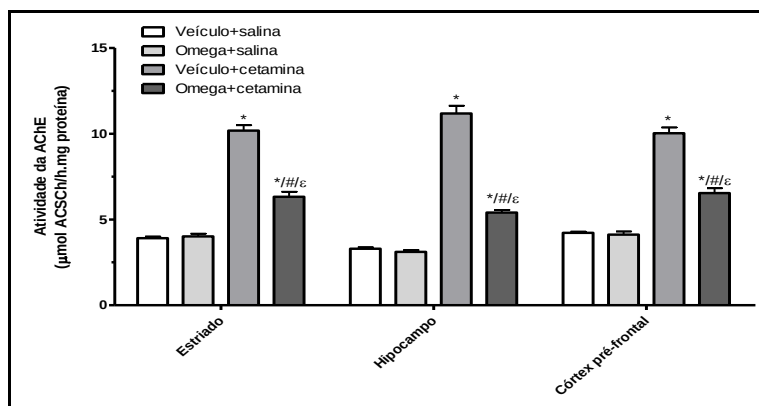
Na figura 10 são demonstrados os valores da atividade da AChE nas diferentes estruturas cerebrais. A ANOVA de duas vias indica que as diferenças entre grupos observadas pelo pós-teste de Newman-Keulls são resultado tanto do efeito da Cetamina [$F(1,16)=293,72$, $p<0,01$ no córtex; $F(1,16)=421,91$, $p<0,01$ no hipocampo; $F(1,16)=336,80$, $p<0,01$ no estriado], do Ômega [$F(1,16)=56,13$, $p<0,01$ no córtex; $F(1,16)=144,65$, $p<0,01$ no hipocampo; $F(1,16)=64,62$, $p<0,01$ no estriado], como da interação entre as variáveis [$F(1,16)=49,83$, $p<0,01$ no córtex; $F(1,16)=127,32$, $p<0,01$ no hipocampo; $F(1,16)=71,98$, $p<0,01$ no estriado].

As comparações entre grupos revelam que em todas as estruturas os grupos tratados somente com cetamina apresentaram aumento da atividade de AChE em relação ao grupo tratado somente com salina ($p<0,01$ em todas as estruturas). O grupo Ômega+cetamina apresentou

valores maiores em relação ao grupo Ômega+salina nas três estruturas ($p<0,01$). Além disso, o grupo Ômega+cetamina apresentou valores diminuídos no córtex, hipocampo e estriado ($p<0,01$) quando comparado ao grupo Veículo+cetamina.

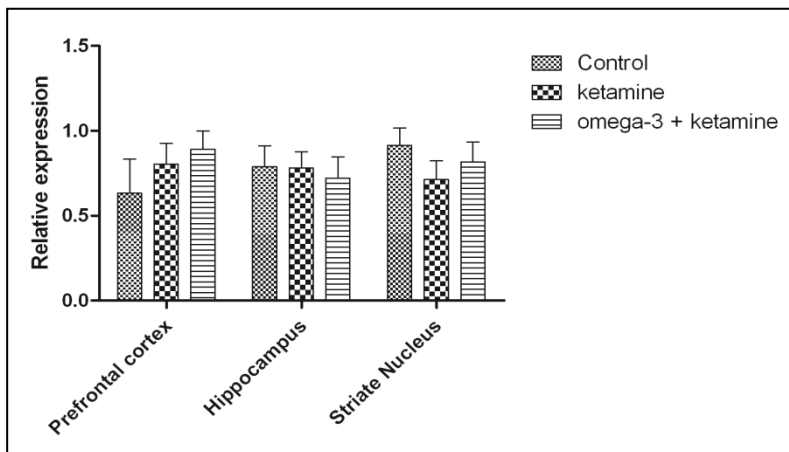
Em conjunto, esses resultados indicam que a cetamina exerce efeitos sobre o sistema colinérgico das três estruturas estudadas e que a suplementação com ômega-3 pode prevenir parcialmente o aumento da AChE induzido por cetamina nas três estruturas. Cabe ressaltar que, quanto à expressão gênica da AChE, não houve nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Figura 10- Atividade da Acetilcolinesterase



Efeito da suplementação de ômega-3 e/ou tratamento com cetamina (25mg/kg) sobre a atividade de AChE em diferentes estruturas cerebrais de ratos. Os dados estão expressos como média±EPM de cinco animais em cada grupo. * Diferente do grupo Veículo+salina, # diferente do grupo Veículo+cetamina, ε diferente do grupo Ômega+salina. (Barras brancas= Veículo+salina; barras cinza claro= Ômega+salina; barras cinza médio= Veículo+cetamina e barras cinza escuro= Ômega+cetamina).

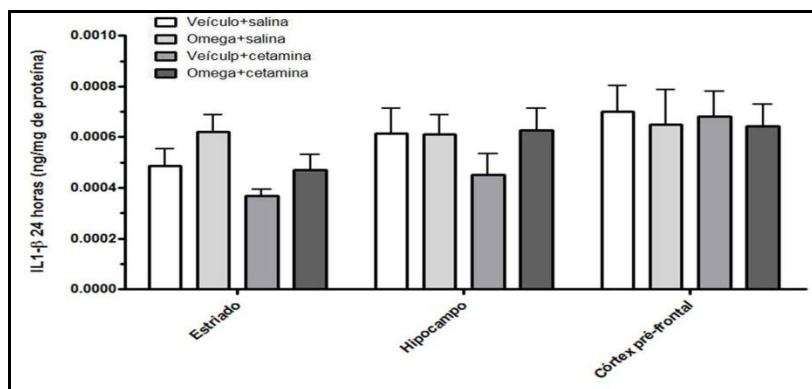
Figura 11- Expressão gênica da AChE



Efeito da suplementação de ômega-3 e/ou tratamento com cetamina (25mg/kg) sobre a expressão gênica de AChE em diferentes estruturas cerebrais de ratos. Não houve diferenças estatísticas entre os grupos.

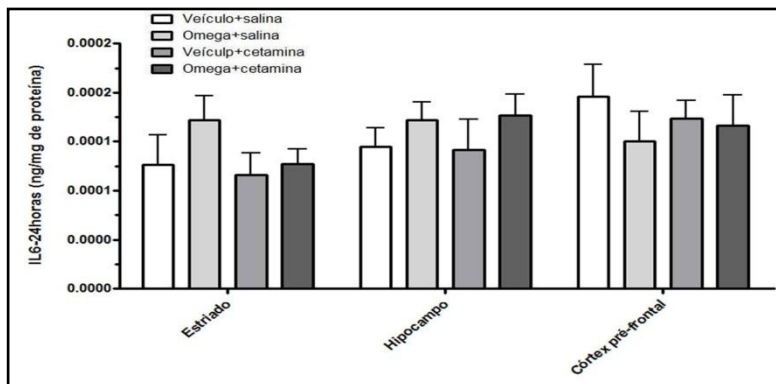
5.3 NÍVEIS DE INTERLEUCINAS (24 HORAS APÓS A ÚLTIMA ADMINISTRAÇÃO DE CETAMINA) EM TECIDOS CEREBRAIS DE RATOS JOVENS SUPLEMENTADOS COM ÔMEGA-3 E SUBMETIDOS AO MODELO ANIMAL DE ESQUIZOFRENIA INDUZIDO POR CETAMINA

A Figura 12 demonstra os valores de interleucina1 β 24 horas após a morte nas diferentes estruturas cerebrais estudadas. A análise estatística indica que as duas variáveis categóricas (Ômega e/ou cetamina) não exerceram efeitos nesse parâmetro.

Figura 12- Interleucinas 1 β 24 Horas

Efeito da suplementação de ômega-3 e/ou tratamento com cetamina (25mg/kg) sobre os níveis de IL1- β 24 horas após a última administração de cetamina em diferentes estruturas cerebrais de ratos. Os dados são expressos como média $\pm$ EPM de cinco animais em cada grupo. (Barras brancas= Veículo+salina; barras cinza claro= Ômega+salina; barras cinza médio= Veículo+cetamina e barras cinza escuro= Ômega+cetamina).

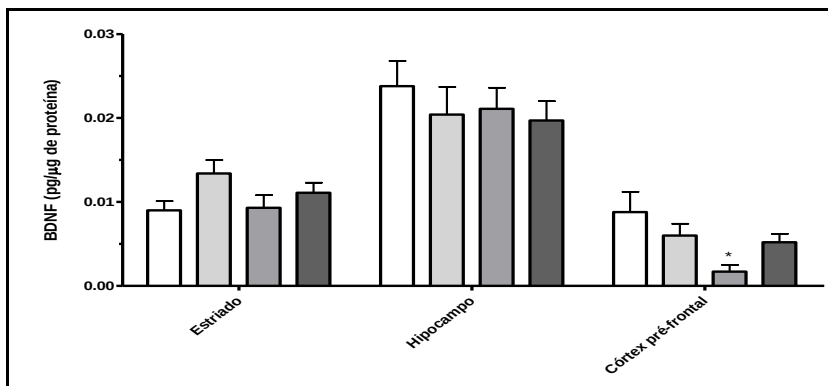
Uma resposta similar após 24 horas foi encontrada nos valores de IL-6. Portanto, não há efeito tardio tanto da suplementação como do tratamento sobre marcadores inflamatórios investigados no estudo.

Figura 13- Interleucinas 6, 24 Horas

Efeito da suplementação de ômega-3 e/ou tratamento com cetamina (25mg/kg) sobre os níveis de IL6 24 horas após a última administração de cetamina em diferentes estruturas cerebrais de ratos. Os dados são expressos como média $\pm$ EPM de cinco animais em cada grupo. (Barras brancas= Veículo+salina; barras cinza claro= Ômega+salina; barras cinza médio= Veículo+cetamina e barras cinza escuro= Ômega+cetamina).

5.4 NÍVEIS DE BDNF (1 HORA E 24 HORAS APÓS A ÚLTIMA ADMINISTRAÇÃO DE CETAMINA) EM TECIDOS CEREBRAIS DE RATOS JOVENS SUPLEMENTADOS COM ÔMEGA-3 E SUBMETIDOS AO MODELO ANIMAL DE ESQUIZOFRENIA INDUZIDO POR CETAMINA

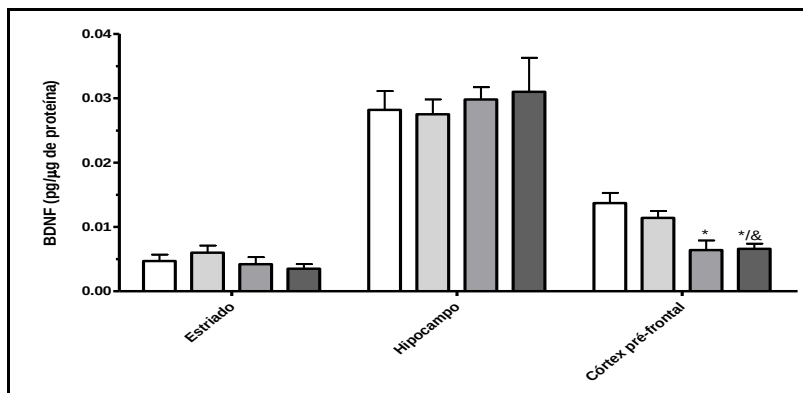
Os dados relativos às concentrações de BDNF indicam que o estriado e hipocampo não apresentam alterações induzidas pela suplementação com ômega-3 ou cetamina. Em contrapartida, os níveis de BDNF no córtex mostram-se diminuídos no grupo tratado com cetamina quando comparado ao grupo controle (Veículo+salina, $p < 0,05$). Nota-se ainda que o demonstrado na figura 14 seja resultado da dosagem de BDNF uma hora após a morte dos animais. Ou seja, essa é uma resposta aguda as intervenções realizadas. Ainda, a análise de duas vias indica um efeito da cetamina nesse parâmetro [$F(1,11) = 6,66$, $p < 0,05$].

Figura 14- Níveis de BDNF 1 Hora

Efeito da suplementação de ômega-3 e/ou tratamento com cetamina (25mg/kg) sobre os níveis de BDNF uma hora após a última administração de cetamina em diferentes estruturas cerebrais de ratos. Os dados são expressos como média $\pm$ EPM de cinco animais em cada grupo. * diferente de Veículo+salina (Barras brancas= Veículo+salina; barras cinza claro= Ômega+salina; barras cinza médio= Veículo+cetamina e barras cinza escuro= Ômega+cetamina).

A Figura 15 apresenta os resultados das concentrações de BDNF nas diferentes estruturas estudadas após 24 horas da última dose de cetamina. Da mesma forma, somente o córtex pré-frontal foi afetado nesse parâmetro. Ambos os grupos que receberam tratamento com cetamina (Veículo+cetamina ou Ômega+cetamina) apresentaram diminuição do BDNF em relação aos grupos Veículo+salina ($p < 0,01$) e Ômega+salina ($p < 0,05$), respectivamente. Portanto, nota-se um efeito tardio da cetamina em reduzir as concentrações de BDNF cerebrais [$F(1,12) = 21,92$, $p < 0,01$]. Além disso, há um efeito seletivo da cetamina sobre córtex pré-frontal.

Figura 15- Níveis de BDNF em 24 Horas



Efeito da suplementação de ômega-3 e/ou tratamento com cetamina (25mg/kg) sobre os níveis de BDNF 24 horas após a última administração de cetamina em diferentes estruturas cerebrais de ratos. Os dados são expressos como média $\pm$ EPM de cinco animais em cada grupo. * diferente de Veículo+salina, & diferente de Ômega+salina (Barras brancas= Veículo+salina; barras cinza claro= Ômega+salina; barras cinza médio= Veículo+cetamina e barras cinza escuro= Ômega+cetamina).

6 DISCUSSÃO

A hipótese de que o ômega-3 pode estar envolvido na etiologia da esquizofrenia é baseada na observação de que os pacientes esquizofrênicos mostram uma redução de ácidos graxos de cadeia longa (n-3 e n-6) (Rubem, 1998). Além disso, em estudo realizado com 45 pacientes diagnosticados com esquizofrenia aferiu-se uma diminuição da pontuação da Escala de Síndrome Positiva e Negativa (PANSS) após a suplementação com PUFA n-3 (Peet et al., 2001). Além disso, existe evidência de que o suplemento com EPA pode acelerar a resposta ao tratamento em melhorar a tolerabilidade à medicação antipsicótica (Berger et al., 2007).

6.1 A PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO POR PRÉ-PULSO

Os nossos resultados comportamentais, demonstrados na Figura 4, indicam que a administração de cetamina em dose de 25mg/kg induz comportamento semelhante ao psicótico e que estas alterações podem ser prevenidas por suplementação com ômega-3. Essas observações ressaltam a importância deste modelo animal para o estudo da esquizofrenia. É bem sabido que a cetamina produz efeitos comportamentais semelhantes aos sintomas positivos e negativos da esquizofrenia em seres humanos (Krystal et al., 1994; Hunt et al., 2006). Devido a estas propriedades, a cetamina foi utilizada para induzir comportamentos esquizóides em modelo animal, condição que permite elucidar os mecanismos ligados à esquizofrenia. Em paralelo, a concepção deste estudo também revela o papel do ômega-3 na prevenção de mudanças de comportamento semelhantes à esquizofrenia. Do ponto de vista dos mecanismos associados aos efeitos terapêuticos, alguns estudos sugerem que os PUFA's podem afetar as células e tecidos por meio de diferentes vias. Em primeiro lugar, o ômega-3 induz a fluidez da membrana celular e pode interagir com os sistemas dopaminérgico e serotoninérgico (Piomelli et al., 1991; Fenton et al., 2000).

6.2. PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO

Uma revisão recente descreve que o ômega-3 influencia na atividade antioxidante (Calder, 2012), sendo que a quantificação de

enzimas antioxidantes age como uma medida indireta do estresse oxidativo. A SOD é responsável por converter o radical superóxido (O_2^-) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), enquanto catalase e glutatiónaperoxidase são responsáveis por metabolizar $O_2 + H_2O_2$ em H_2O . No entanto, se o mecanismo para a eliminação de ROS falhar pode causar danos celulares, tais como a peroxidação de lipídios (membranas e organitos), proteínas (enzimas e receptores) e o ADN (Garcia et al., 2005).

Nossos dados, a partir da Figura 5, indicam que no estriado, a suplementação de ômega-3 parcialmente inverteu a diminuição da atividade da GPx, que foi induzida por cetamina. Diferentes padrões de atividade foram observados no hipocampo e no córtex pré-frontal. No hipocampo, o efeito benéfico do ômega-3 na promoção do aumento da atividade da GPx foi revertida, enquanto que, o aumento induzido por cetamina que foi revertido por ômega. Tomados em conjunto, os dados apresentados na Figura 5 indicam que os efeitos benéficos do ômega-3 são seletivos para o estriado e hipocampo. Em relação à atividade da SOD (Figura 6), ambos, de cetamina ou Ômega-3, contribuíram para o aumento dos níveis, enquanto a combinação de cetamina e ômega-3 diminuiu os valores da SOD. Foi observada redução semelhante resultante de uma combinação de cetamina e ômega-3 na atividade de CAT no córtex (Figura 7).

De acordo com a literatura, a heterogeneidade dos resultados referentes às enzimas antioxidantes é dependente das áreas cerebrais estudadas, bem como do tipo de enzima. Similares resultados mistos foram observados em outro estudo do nosso grupo (De Oliveira et al., 2009). Alguns estudos indicam que o estresse oxidativo é um mecanismo patogênico comum subjacente a muitos transtornos psiquiátricos, considerando-se que o cérebro tem comparativamente maior vulnerabilidade ao dano oxidativo (Felicity et al., 2008).

Juntamente com estas evidências, uma diminuição na atividade de SOD e GPx foi observada em pacientes esquizofrênicos (Zhang et al., 2006). Considerando-se a quantificação dos produtos finais da peroxidação lipídica e dano oxidativo de proteínas, os nossos resultados indicam que todos os grupos que receberam cetamina (25mg/kg) sofreram danos às proteínas de membrana.

Considerando-se a quantificação dos produtos finais da peroxidação lipídica e dano oxidativo de proteínas, os nossos resultados indicam que todos os grupos que receberam cetamina (25mg/kg) mostraram danos ao nível das proteínas da membrana e lipídios no

córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado. Por outro lado, a associação entre ômega-3 e cetamina induziu uma diminuição destes parâmetros no hipocampo e estriado (em relação ao dano de lipídios) e uma diminuição no córtex pré-frontal e estriado (em relação ao dano de proteína). Estas observações dão uma forte indicação que a suplementação com ômega-3 atua como um agente protetor contra o estresse oxidativo em diferentes áreas do cérebro. Algumas evidências reforçam o papel fundamental dos PUFA's ômega-3 na manutenção do funcionamento cerebral. De acordo com Gomez-Pinilla (2008), PUFA's, como parte da membrana celular, têm por objetivo facilitar a plasticidade sináptica e melhorar a atividade mitocondrial, o que reduz o dano intracelular em marcadores de estresse oxidativo. Consequentemente, os efeitos protetores do ômega-3 podem estar associados com a prevenção de sintomas psicóticos em pacientes com maior risco de desenvolver esquizofrenia (Amminger et al., 2010).

Além disso, os nossos resultados sobre os efeitos da cetamina em gerar aumento de dano aos lipídios e proteínas são semelhantes às observações de estudos em humanos, demonstrando um aumento de produtos da peroxidação lipídica em pacientes esquizofrênicos não tratados (Arvindakshan et al. 2003a; Petronijevic et al., 2003; Young et al., 2007). Achados semelhantes foram descritos em pacientes esquizofrênicos tratados com haloperidol ou clozapina (Gama et al., 2006). Além disso, existe uma relação inversa entre os marcadores oxidativos e níveis séricos de BDNF (Kapczinski et al., 2008).

6.3 ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE (ACHE)

A supressão da quantidade de ACh provoca a perda massiva da capacidade de ação do SNC (Parent et al., 2013). Entre outras consequências, a diminuição na concentração da ACh está relacionada diretamente com o déficit cognitivo, característica marcante em pacientes acometidos pela esquizofrenia (Sugimoto et al., 2002; Tezer, 2005; Voss et al., 2008). Ainda, estudos epidemiológicos têm demonstrado que o percentual de tabagismo na população de pacientes esquizofrênicos é maior do que na população em geral. Nestes pacientes, os sintomas positivos são mais graves, indicando que os receptores de ACh podem estar relacionados com esta doença (De Leon e Diaz, 2005; Nishimoto et al., 2011). O papel da enzima AChE sobre os sintomas cognitivos também tem sido identificados (Bergman e Lerner, 2002; Ribeiz et al., 2010).

Através do desenho experimental aplicado nesse estudo, foi possível observar que o tratamento com cetamina induziu aumento na atividade da AChE no córtex, hipocampo e estriado dos animais. Uma meta análise recente demonstra que o déficit cognitivo de pacientes esquizofrênicos e com transtorno esquizoafetivo são sensíveis a rivastigmina, donepezil e galantamina (inibidores da AChE usados na Doença de Alzheimer) (Bergman e Lerner, 2002; Ribeiz et al., 2010). De modo similar, um estudo pré-clínico publicado recentemente pelo nosso laboratório indica que a rivastigmina é capaz de reduzir o déficit cognitivo induzido pela cetamina em animais. Nesse mesmo estudo, o perfil comportamental desses animais é associado com a redução da atividade da AChE em diferentes estruturas cerebrais (Zugno et al., 2013). Portanto, o aumento da AChE observado nos nossos grupos experimentais é semelhante a estudos publicados anteriormente. Além disso, o aumento da AChE têm sido frequentemente associado a sintomas similares da esquizofrenia, tanto em humanos como em animais (Ribeiz et al., 2010; Zugno et al., 2013).

Um importante resultado desse estudo é o fato da suplementação com Ômega-3 prevenir, em parte, o aumento da AChE induzido pelo tratamento com cetamina. Logo, a suplementação de Ômega-3 é capaz de modular o sistema colinérgico. O Ômega-3 (ácido graxo α linoleico, ALA, 18:3) é um ácido graxo que não pode ser sintetizado endogenamente. Desta forma, níveis adequados de Ômega-3 podem ser alcançados através da ingestão de óleos de peixe como salmão, sardinha, atum e cavalinha (Masrszalek e Lodish, 2005). Através da ação de enzimas hepáticas o ALA ingerido dá origem aos PUFAs, compostos que tem um importante papel na sinalização celular, regulação enzimática, síntese de eicosanoides, regulação da migração neuronal., determinação da plasticidade sináptica e modulação de citocinas (Haag, 2003; Masrszalek e Lodish, 2005). Além disso, outras evidências sugerem o envolvimento do Ômega-3 na fisiopatologia da esquizofrenia, ressaltando que a suplementação diminui o risco de progressão do transtorno psicótico em jovens com prévios estados psicóticos (Amminger et al., 2010). Da mesma forma, uma pesquisa pré-clínica desenvolvida pelo nosso grupo evidenciou o efeito preventivo dos sintomas positivos e negativos do Ômega-3 em um modelo animal de esquizofrenia induzido por cetamina (Gama et al., 2012).

A compreensão dos mecanismos pelos quais o Ômega-3 induz alterações em sistemas de neurotransmissão relacionados à esquizofrenia ainda representa um desafio para a comunidade científica.

A diminuição na atividade da AChE observada no grupo que recebeu suplementação e tratamento com cetamina é possivelmente um resultado da ação do Ômega-3 sobre o sistema glutamatérgico, e, consequentemente, colinérgico. Um estudo publicado recentemente indica que uma dieta enriquecida com ômega-3 foi capaz de reverter o decréscimo da atividade de subunidades de receptores NMDA e AMPA que ocorre em animais envelhecidos (Dyall et al., 2006). Ainda foi demonstrado que o DHA pode modular o transporte de glutamato de maneira dose-dependente e em situações de dano cerebral (Grintal. et al., 2009; Moreira et al., 2010). Portanto, é possível inferir que o Ômega-3 seja capaz de limitar a ação da cetamina e gerar, por consequência, uma resposta menos pronunciada na atividade da AChE nas estruturas cerebrais nesse grupo.

O presente trabalho traz evidências de que tanto a cetamina como o Ômega-3 exerce efeito sobre o sistema colinérgico. Novos estudos, com maior amplitude de análises, são necessários para fortalecer as questões abordadas nessa discussão.

6.4 OS NÍVEIS DE INTERLEUCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS

As IL conhecidas também por linfocinas – são proteínas (polipeptídeos) envolvidas na comunicação entre linfócitos. Algumas IL são produzidas por várias células não leucocitárias. Existem evidências de níveis diminuídos de IL-2 e IL-6 e de redução na resposta imune mediada por células T (Patterson et al., 2009; Singh et al., 2009).

Atualmente, pesquisas abordando o papel da neuroinflamação na esquizofrenia estão ganhando evidência. Considera-se neuroinflamação a ativação de células da microglia, as células inflamatórias residentes no cérebro, podendo também envolver outras células linfóides que se infiltram no cérebro. Foram encontrados 140 trabalhos abordando inflamação ou neuroinflamação e esquizofrenia. Pesquisadores mostraram que um processo neuroinflamatório foi encontrado no hipocampo de 07 pacientes em fase de recuperação de um surto psicótico, utilizando para esta determinação a técnica de PET scan. Esses dados sugerem que a neuroinflamação tem um papel importante na esquizofrenia, principalmente durante a psicose (Doorduyn et al., 2009).

Foi encontrada uma associação com IL-6 e sintomatologia aguda em transtorno bipolar e esquizofrenia (Naudin et al., 1996; Brietzke et al., 2009). Considerando que a comparação envolveu pacientes em fases

não agudas da doença, a conclusão é que existe um aumento da presença de IL-6 na esquizofrenia fornecendo uma evidência adicional de que há uma ativação imunitária crônica e síndrome inflamatória neste transtorno (Potvin et al., 2008).

Diferentemente do que tem sido observado nas pesquisas em humanos, o modelo animal de cetamina e/ou suplementação com ômega-3 não induziu alterações nas interleucinas estudadas (IL1 β , IL6), medidas 24 horas após a última injeção. Estudos com cetamina na dose de 30mg/kg intraperitoneal, demonstraram um aumento da atividade locomotora, do comportamento, do movimento de descolamento da cabeça e das alterações bioquímicas em alguns tecidos cerebrais, apontando como limitação do modelo alterações significativas no sistema imune (Bertolizio et al., 2013).

Por outro lado, em humanos, estudos de PET medindo a ocupação dos receptores dopaminérgicos após a administração de cetamina sugeriram que antagonistas NMDA aumentam a liberação de dopamina no núcleo estriado (Smith et al., 1998) e esses efeitos são suprimidos, pelo menos em parte, por drogas antipsicóticas (Corbett et al., 1995; Irifune et al., 1995). A cetamina mostra afinidade muito similar pelos receptores NMDA e D2, com menor afinidade por sítios 5HT2. Em trabalho recente, Becker e colaboradores (2003) demonstraram que a cetamina administrada por cinco dias causa alterações nas neurotransmissões dopaminérgicas, glutamatérgicas e serotoninérgicas, produzindo aumento do receptor D2 no hipocampo, redução do receptor glutamatérgico no córtex frontal, aumento do transportador da dopamina no estriado e do transportador da serotonina no estriado, hipocampo e córtex frontal.

A inflamação é um componente importante na manutenção da homeostase do organismo. No entanto, uma resposta inflamatória pode estar associada à perda deste estado de homeostase, levando à lesão do tecido ou disfunção de órgãos. Um grande número de drogas interage com a resposta inflamatória de um modo positivo, negativo ou "duplo". Dentre estes medicamentos, a cetamina parece ter um efeito positivo significativo sobre a regulação da inflamação. Este antagonista de receptor de NMDA atua em diferentes níveis de inflamação interagindo na mobilização de células inflamatórias, na produção de citocinas, mediadores inflamatórios e de regulação. O efeito dessas interações confere à cetamina uma ação anti-inflamatória, limitando a exacerbação da inflamação sistêmica sem afetar os processos de cura locais. Esta avaliação leva a uma visão completa das propriedades imuno

moduladoras desta substância anestésica complexa (Loix et al., 2011).

A ação anti-inflamatória da cetamina foi descrita numa recente revisão que considerava estas evidências (Bonhomme et al., 2011) Na base destes achados sugere-se que a similaridade dos níveis de IL1 β e IL6 nos nossos grupos experimentais deve-se ao mecanismo de ação da cetamina sobre o sistema imune. Neste sentido, ressalta-se a necessidade de pesquisas com novos modelos de esquizofrenia para verificar alterações do nível do sistema imune, considerando que a inflamação apresenta papel importante nesta psicopatologia.

Estudos futuros devem avaliar mais profundamente o papel das citocinas pro-inflamatórias e da autoimunidade na fisiopatologia na esquizofrenia, o que poderá conduzir estratégias de intervenções farmacológicas mais específicas e eficazes para o tratamento deste transtorno que provoca grande comprometimento na qualidade de vida do paciente e de sua família.

6.5 OS NÍVEIS DE BDNF EM TECIDOS

O BDNF desempenha um importante papel no neurodesenvolvimento e plasticidade neural. Uma redução no funcionamento do BDNF pode contribuir para a patogênese da esquizofrenia. No entanto, os níveis de BDNF não são estáticos. Em experimentos com animais, o BDNF no cérebro aumenta durante a aprendizagem espacial e na depressão clínica, o tratamento antidepressivo bem sucedido aumenta BDNF no soro (Kaneda et al., 2009).

Um estudo com humanos demonstrou que níveis séricos de BDNF são aumentados significativamente em pacientes clinicamente estáveis, indivíduos com esquizofrenia, doentes crônicos após o treinamento cognitivo baseado em neuroplasticidade, mas não depois de jogos de computador. Os níveis séricos de BDNF podem servir como um biomarcador periférico para os efeitos do treinamento cognitivo intensivo e podem fornecer uma ferramenta útil para a avaliação de métodos de melhoramento cognitivos na esquizofrenia (Vinogradove et al., 2009). Em outro estudo, os resultados sugeriram que o BDNF pode estar envolvido na patofisiologia da esquizofrenia e da sua deterioração cognitiva associada, especialmente a memória imediata (Zhang et al., 2012).

No presente estudo, administramos a cetamina de forma crônica com a finalidade de causar um dano neural e os resultados obtidos

indicam que a cetamina reduziu o BDNF no córtex pré-frontal, tanto 1h quanto 24h após. Ainda, essa diminuição não foi prevenida pela ingestão de ômega-3 por 21 dias. O presente resultado confirma a maior parte de estudos realizados nesta área, demonstrando que para ocorrer uma redução de BDNF é necessária uma intervenção mais severa (Molteni et al., 2002). É possível que o aumento da dose ou duração do tratamento com cetamina influencie alterações mais exacerbadas desse marcador.

Contudo, estudos *post mortem* identificaram alteração na densidade de receptores glutamatérgicos e em sua composição no córtex pré-frontal, tálamo e lobo temporal, áreas que apresentam ativação diminuída durante testes de *performance* em esquizofrênicos. A administração crônica de fenciclidina reduz o *turnover* de dopamina no córtex frontal e aumenta a liberação de dopamina em regiões subcorticais, particularmente no núcleo accumbens. Essa e outras evidências demonstram a interligação dos sistemas glutamatérgico e dopaminérgico, evidenciando que são conceitos complementares na compreensão da patogênese da esquizofrenia.

O glutamato tem um papel importante na migração neuronal, no desenvolvimento de neurites, na sinaptogênese e na poda neuronal por apoptose. Há uma grande diversidade de subtipos de receptores glutamatérgicos que são codificados geneticamente, mas cuja expressão pode ser alterada por fatores ambientais durante o desenvolvimento cerebral, criando um modelo de disfunção glutamatérgica para a interação de fatores de risco genéticos e ambientais observados na esquizofrenia (Goff e Coyle, 2001). Numa formulação mais recente, uma hipofunção dopaminérgica no córtex pré-frontal seria responsável pelos sintomas negativos e um evento primário na esquizofrenia, levando a uma hiperfunção dopaminérgica secundária no estriado, o que, por sua vez, levaria ao surgimento dos sintomas positivos (Stone et al., 2007).

Os achados acima referenciados reforçam os resultados obtidos no presente estudo, em que a queda nas concentrações de BDNF nas diferentes estruturas estudadas após 1 e 24 horas da última injeção de cetamina ocorreu somente no córtex pré-frontal. Sendo que ambos os grupos receberam tratamento com cetamina (Veículo+cetamina ou Ômega+cetamina), pode-se inferir que o ômega-3 preveniu-a totalmente 01 hora após a última injeção, mas não após 24h.

7 CONCLUSÃO

O presente estudo testou a hipótese de que o ácido graxo poli-insaturado Ômega-3 previne alterações comportamentais e bioquímicas em animais submetidos ao modelo animal de esquizofrenia induzido por cetamina. A metodologia aplicada foi composta de uma análise comportamental e diversas análises bioquímicas. A análise dos dados deste trabalho indica que o Ômega-3 é eficaz no sentido de prevenir alterações comportamentais, aumentar a resposta antioxidante endógena e reduzir o dano em lipídios e proteínas. A suplementação também foi capaz de reduzir os efeitos da administração de cetamina sobre o sistema colinérgico, fator este evidenciado pelos níveis de AChE. Além disso, a suplementação com Ômega-3 é capaz de retardar os efeitos da cetamina sobre os níveis de BDNF, um possível indicador de proteção desse ácido graxo. Em contrapartida, esse desenho experimental gerou respostas semelhantes nos níveis de interleucinas, ou seja, tanto a suplementação como o tratamento i.p. com cetamina não exercem efeito sobre esse parâmetro. Em conjunto, é possível afirmar que o modelo animal de esquizofrenia induzida pela administração de cetamina é capaz de induzir uma variedade de alterações sobre o comportamento, resposta antioxidante, sistema colinérgico e níveis de BDNF, as quais podem ser prevenidas pela ação do Ômega-3. Esses dados ressaltam o importante papel da dieta rica em ácidos graxos poliinsaturados na prevenção de doenças e torna-se necessário o aprofundamento de pesquisas sobre os mecanismos desses efeitos protetores.

REFERÊNCIAS

Abi-Dargham A, Laruelle M. Mechanisms of action of second generation antipsychotic drugs in schizophrenia: insights from brain imaging studies. *Eur Psychiatry*. 2005; 20(1): 15-27.

Amminger GP, Schafer MR, Papageorgiou K, Klier CM, Cotton SM, Harrigan SM, Mackinnon A, Mc Gorry PD, Berger GE. Long-chain w-3 fatty acids for indicated prevention of psychotic disorders. *Arch Gen Psychiatry*. 2010; 67(2): 146-154.

Angrist B, Sathananthan G, Wilk S. Amphetamine psychosis: behavioral and biochemical aspects. *J Psychiatr Res*. 1974;11: 13-23.

APA - American Psychiatric Association, Diagnostic and Statistical. Manual of Mental Diseases, fourth edition (DSM-IV). Washington, DC: APA, 1994. 886 p.

Arvindakshan M, Sitasawad S, Debsikdar V, Ghate M, Evans D, Horrobin DF, Bennett C, Ranjekar PK, Mahadik SP. Essential polyunsaturated fatty acid and lipid peroxide levels in never-medicated and medicated schizophrenia patients. *Biol Psychiatry*. 2003a; 53(1): 56-64.

Arvindakshan M, Ghate M, Ranjekar PK, Evans D, Mahadik SP. Supplementation with a combination of w-3 fatty acids and antioxidants (vitamins E and C) improves the outcome of schizophrenia. *Schizophr Res*. 2003b; 62 (3): 195-204.

Bannister JV, Calabrese L. Assays for superoxide dismutase. *Methods Biochem Anal*. 1987; 32: 279-312.

Bazan NG. Neuroprotectin D1 (NPD1): a DHA-derived mediator that protects brain and retina against cell injury-induced oxidative stress. *Brain Pathol*. 2005; 15 (2): 159-166.

Bazan NG. Cell survival matters: docosahexaenoic acid signaling, neuroprotection and photoreceptors. *Trends Neurosci*. 2006; 29(5): 263-271.

Becker A, Peters B, Shroeder 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.

Becker A, Grecksch G. Ketamine-induced changes in rat behavior: a possible animal model of schizophrenia. Test of predictive validity. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2004; 28 (8):

1267-1277.

Berger GE, Proffitt TM, McConchie M, Yuen H, Wood SJ, Amminger GP, Brewer W, McGorry PD. Ethyl-eicosapentaenoic acid in first-episode psychosis: a randomized, placebo-controlled trial. *J Clin Psychiatry*. 2007; 68(12): 1867-1875.

Bergman J, Lerner V. Successful use of donepezil for the treatment of psychotic symptoms in patients with Parkinson's disease. *Clin Neuropharmacol*. 2002; 25 (2):107-110.

Bertolizio G, Stucchi R, Sahillioglu E, Somaini M, Dander E, Biondi A, Jankovic M, D'Amico G, Ingelmo PM. The effects of propofol and ketamine in the cytokine levels of children with acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2013; 35(7):296-300.

Brietzke E, Stertz L, Fernandes BS, Kauer-Sant'anna M, Mascarenhas M, Escosteguy AV, Chies JA, Kapczinski F. Comparison of cytokine levels in depressed, manic and euthymic patients with bipolar disorder. *J Affect Disord*. 2009;116(3):214-217.

Bubenikova-Valesova V, Horacek J, Vrajova M, Hoschl C. Models of schizophrenia in humans and animals based on inhibition of NMDA receptors. *Neurosci Biobehav*. 2008; 32:1014–1023.

Bonefeld BE, Elfving B, Wegener G. Reference genes for normalization: a study of rat brain tissue. *Synapse*. 2008; 62 (4): 302-309.

Bonhomme V, Boveroux P, Vanhaudenhuyse A, Hans P, Brichant JF, Jaquet O, Boly M, Laureys S. Linking sleep and general anesthesia mechanisms: this is no walkover. *Acta Anaesthesiol Belg*. 2011; 62 (3):161-171.

Burr GO. The essential fatty acids fifty years ago. *Prog Lipid Res*. 1981; 20: 3-10.

Calder PC. Mechanisms of action of (n-3) fatty acids. *J Nutr*. 2012;142(3): 592S-599S.

Cardoso CS, Caiaffa WT, Bandeira M, Siqueira AL., Abreu MA, Fonseca JO. Factors associated with a low quality of life in schizophrenia. *Cad Saúde Pública*. 2005; 21 (5): 1338-1348.

Casolini P, Catalani A, Zuena AR, Angelucci L. Inhibition of COX-2 reduces the age-dependent increase of hippocampal inflammatory markers, corticosterone secretion, and behavioral impairments in the rat. *J Neurosci Res*. 2002; 68 (3):337–343.

Cepeda C, Levine MS. Dopamine and N-methyl-D-aspartate receptor interactions in the neostriatum. *Dev Neurosci*. 1998; 20 (1):1-

18.

Corbett R, Camacho F, Woods AT, Kerman LL, Fishkin RJ, Brooks K, Dunn RW. Antipsychotic agents antagonize non-competitive N-methyl-Daspartate antagonist-induced behaviors. *Psychopharmacology*.1995;120: 67-74.

Davies KJ. Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *ILIBM Life*. 2000; 50 (4-5): 279-289.

De Leon J, Diaz FJ. A meta-analysis of worldwide studies demonstrates an association between schizophrenia and tobacco smoking behaviors. *Schizophr Res*. 2005;76 (2-3):135-157.

DeLisi LE. Reviewing the facts about schizophrenia: a possible of impossible task? *Schizophr Res*. 2008;102(1-3):19-20.

DeOliveira L; Spiazzi CM; Bortolin T; Canevar L; Petronilho F; Mina FG; Dal.-Pizzol F; Quevedo J; Zugno AI. Different sub-anesthetic doses of ketamine increase oxidative stress in the brain of rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2009; 33 (6): 1003-1008.

Divry P, Bobon J, Collard J. Le R1625, nouvelle therapeutique symptomatique de l'agitation psychometrice. *Acta Neurol Psychiatr Belg*. 1959; 58: 878-888.

Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol*.1990; 186: 421-431.

Doorduyn J, De Vries EF, Willemsen AT, De Groot JC, Dierckx RA, Klein HC. Neuroinflammation in schizophrenia-related psychosis: a PET study. *J Nucl Med*. 2009; 50(11):1801-1807.

Dyall SC, Michael GJ, Whelpton R, Scott AG, Michael-Titus AT. Dietary enrichment with omega polyunsaturated fatty acids reverses age-related decreases in the GluR2 and NR2B glutamate receptor subunits in rat forebrain. *Neurobiol Aging* 2007; 28 (3): 424-439.

Ellman GL; Courtney KD; Andres VJR; Feather-Stone RMA. New and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*. 1961;7: 88-95.

Falkai P, Wobrock T, Lieberman J, Glenthøj B, Gattaz WF; Møller HJ. Task force on treatment guidelines for schizophrenia. World Federation of Societies of Biological Psychiatry (WFSBP) guidelines for biological treatment of schizophrenia. Part 1: acute treatment of schizophrenia. *World J Biol Psychiatry*. 2005; 6 (3): 132-191.

Felicity NG, Berk M, Dean O, Bush AI. Oxidative stress in psychiatric disorders: evidence base and therapeutic implications. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2008;11 (6): 851-876.

Fenton WS, Hibbeln J, Knable M. Essential fatty acids, lipid membrane abnormalities, and the diagnosis and treatment of schizophrenia. *Biol Psychiatry*. 2000; 47(1): 8-21.

Gama CS, Salvador M, Andreazza AC, Lobato MI, Kapczinski F, Belmonte-de-Abreu PS. Elevated serum superoxide dismutase and thiobarbituric acid reactive substances in schizophrenia a study of patients treated with haloperidol or clozapina, *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2006; 30(3):512-515

Gama CS, Canever L, Panizzutti B, Gubert C, Stertz L, Massuda R, Pedrini M, de Lucena DF, Luca RD, Fraga DB, Heylmann AS, Deroza PF, Zugno AI. The 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; Nov;141(2-3):162-167.

Garcia-Alonso J, Periago MJ, Vidal-Guevera ML, Ramirez Tortosa M, Gil A, Ros G. Evaluación nutricional y estado antioxidante de un grupo de ancianos institucionalizados de Murcia(España). *Arch Latinoam Nutr*. 2004; 54(2): 180-189.

Garcia YJ, Rodriguez-Malaver AJ, Penalzoa N. Lipid peroxidation measurement by thiobarbituric acid assay in rat cerebellar slices. *J Neurosci Methods*. 2005;144 (1):127–135.

García-Ayllón MS, Small DH, Avila J, Sáez-Valero J. Revisiting the role of acetylcholinesterase in Alzheimer's disease: cross-talk with p-tau and b-amyloid. *Front Mol Neurosci*. 2011;4:1-9.

Garver DL; Tamas RL; Holcomb JA. Elevated interleukin-6 in the cerebrospinal fluid of a previously delineated schizophrenia subtype. *Neuropsychopharmacology*. 2003; 28 (8): 1515–1520.

Geyer MA, Krebs-Thomson K, Braff DL, Swerdlow NR. Pharmacological studies of prepulse inhibition models of sensorimotor gating deficits in schizophrenia: a decade in review. *Psychopharmacology (Berl)*. 2001; 156, (2-3):117- 154.

Grntal B, Champeil-Potokar G, Lavialle M, Vancassel S, Breton S, Denis I. Inhibition of astroglial glutamate transport by polyunsaturated fatty acids: evidence for a signal liing role of docosahexaenoic acid. *Neurochem Int*. 2009; 54 (8): 535-543.

Goff DC, Coyle JT. The emerging role of glutamate in the pathophysiology and treatment of schizophrenia. *Am J Psychiatry*. 2001;158 (9):1367-1377.

Gomez-Pinilla F. Brain foods: the effects of nutrients on brain function. *Nature reviews*. *Nat Rev Neurosci*. 2008; 9(7): 568-578.

Halliwel B. Oxidative stress and neurodegeneration: Where are we now? *J Neurochem.* 2006; 97 (6): 1634-1658.

Haag M. Essential fatty acids and the brain. *Can J Psychiatry.* 2003; 48 (3): 195-203

Hanson DR; Gottesman II. Theories of schizophrenia: a genetic-inflammatory-vascular synthesis. *BMC Med Genet;* 2005; 6 (7): 1-17.

Hashimoto K, Shimizu E, Iyo M. Critical role of brain-derived neurotrophin factor in mood disorders. *Brain Res Rev.* 2004; 45 (2): 104-114.

Heird WC, Lapillonne A. The role of essential fatty acids in development. *Annu Rev Nutr.* 2005;25:549-571.

Heresco-Levy U. Glutamatergic neurotransmission modulation and the mechanism of antipsychotic atypicality. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2003; 27 (7):1113-1123

Hetem LA, Danion JM, Diemunsch P, Brandt C. Effect of a subanesthetic dose of ketamine on memory and conscious awareness in healthy volunteers. *Psychopharmacology.* 2000;152 (3): 283-288.

Hoffman HS, Ison JR. Reflex modification in the domain of startle: I Some empirical findings and their implications for how the nervous system processes sensory input. *Psychol Rev.* 1980; 87 (2):175-189.

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): 1206-1214.

Imre G; Fokkema DS; Den Boer JA; Ter Horst GJ. Dose-response characteristics of ketamine effect on locomotion, cognitive function and central neuronal activity. *Brain Res Bull.* 2006; 69 (3): 338-345.

Irving HM, Samokhvalov AV; Rehm J. Alcohol as a risk factor for pancreatitis: a systematic review and meta-analysis. *JOP.* 2009; 10(4):387-392.

Irifune M; Shimizu T; Nomoto M; Fukuda T. Involvement of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors in noncompetitive NMDA receptor antagonist-induced hyperlocomotion in mice. *Pharmacol Biochem Beh.* 1995; 51 (2-3): 291-296.

Janssen PAJ. Haloperidol and the butyrophenones: the early years. In: Ban TA, Ray OS (Eds.). *A History of the CINP.* Brentwood: JM Productions, 1996. p. 44-48.

Jentsch JD, Roth RH. The neuropsychopharmacology of phencyclidine: from NMDA receptor hypofunction to the dopamine

hypothesis of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*.1999; 20 (3): 201-225.

Kane JM, Krystal J, Correll CU. Treatment models and designs for intervention research during the psychotic prodrome. *Schizophr Bull*. 2003; 29 (4): 747-756.

Kaneda Y, Jayathilak K, Meltzer HY. Determinants of work outcome in schizophrenia and schizoaffective disorder: role of cognitive function. *Psychiatry Res*. 2009;169(2):178–179.

Kapur S, Zipursky R, Jones C, Remington G, Houle S. Relationship between dopamine D2 occupancy, clinical response, and side effects: A double-blind PET study of first-episode schizophrenia. *Am J Psychiatry*. 2000; 157(4):514-520.

Kapur S, Seeman P. Does fast dissociation from the dopamine d(2) receptor explain the action of atypical antipsychotics? A new hypothesis. *Am J Psychiatry* 2001;158 (3):360-369.

Kapur S, Remington G. Dopamine D(2) receptors and their role in atypical antipsychotic action: still necessary and may even be sufficient. *Biol Psychiatry*. 2001; 50 (11): 873-883.

Kapczinski F, Frey BN, Kauer-Sant'Anna M, Grassi-Oliveira R. Brain-derived neurotrophic factor and neuroplasticity in bipolar disorder. *Exp Rev Neurother*. 2008; 8 (7):1101-1113.

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): 381-390.

Kim JS, Kornhuber W; Schmid-Burgk B; Holzmüller B. Low cerebrospinal fluid glutamate in schizophrenic patients and a new hypothesis on schizophrenia. *Neurosci Lett*. 1980; 20 (3): 379-382.

Kinkead B, Selz KA, Owens MJ, Mandell AJ. Algorithmically designed peptides ameliorate behavioral defects in animal model of ADHD by an allosteric mechanism. *J Neurosci Methods*. 2006; 151(1): 68-81.

Kotter R. Postsynaptic integration of glutamatergic and dopaminergic signals in the striatum. *Prog Neurobiol*. 1994; 44 (2):163-196.

Krystal JH; Karper LP; Seibyl JP; Freeman GK; Delaney R; Bremner JD, Heninger GR; Bowers MB Jr; Charney DS. Subanesthetic effects of the noncompetitive NMDA antagonist, ketamine, in humans. Psychotomimetic, perceptual, cognitive, and neuroendocrine responses. *Arch Gen Psychiatry*.1994; 51 (3): 199-214.

Kronig H, Riedel M, Schwarz MJ, Strassnig M, Moller HJ, Ackenheil M, Muller N. ICAM G241A polymorphism and soluble ICAM-1 serum levels: evidence for an active immune process in schizophrenia. *Neuroimmunomodulation*. 2005;12 (1): 54-59.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227(5259): 680-85.

Lahti AC, Holcomb HH, Medoff DR, Tamminga CA. Ketamine activates psychosis and alters limbic blood flow in schizophrenia. *Neuroreport*. 1995; 6 (6):869-872.

Laruelle M, Abi-Dargham A, Van Dyck CH, Gil R, D'Souza CD, Erdos J, McCance E, Rosenblatt W, Fingado C, Zoghbi SS, Baldwin RM, Seibyl JP, Krystal JH, Charney DS, Innis RB. Single Photon Emission Computerized Tomography imaging of amphetamine-induced dopamine release in drug-free schizophrenic subjects. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996; 93 (17): 9235-9240.

Lehman AF, Lieberman JA, Dixon LB, McGlashan TH, Miller AL, Perkins DO, Kreyenbuhl J. Practice guideline for the treatment of patients with schizophrenia, second edition. *Am J Psychiatry*. 2004;161(2): 1-56.

Levine RL, Williams JA, Stadtman ER, Shacter E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol*. 1994; 233: 346-357.

Loix S, De Kock M, Henin P. The anti-inflammatory effects of ketamine: state of the art. *Acta Anaesthesiol Belg*. 2011;62(1):47-58.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951; 193(1): 265-275.

Lukiw WJ, Bazan NG. Docosahexaenoic acid and the aging brain. *J Nutr*. 2008; 138 (12): 2510-14.

Mari JJ; Leitão RJ. A epidemiologia da esquizofrenia. *Rev Bras Psiquiatr*. 2000; 22 (1):15-17.

Masrszalek JR, Lodish HF. Docosahexaenoic acid, fatty acid interacting proteins, and neuronal function: breastmilk and fish are good for you. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2005; 21: 633-657.

Massoulié J, Bon S. The C-terminal T peptide of cholinesterases: structure, interactions on protein and secretion. *J Mol Neurosci*. 2006; 30 (1-2):233-236.

Mahadik SP, Evans D, Lal H. Oxidative stress and role of antioxidant and omega-3 essential fatty acid supplementation in

schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2001; 25(3): 463-493.

Mcgorry PD, Yung AR, Bechdolf A, Amminger P. Back to the future: predicting and reshaping the course of psychotic disorder. *Arch Gen Psychiatry*. 2008; 65 (1):25-27.

Meisenzahl EM, Rujescu D, Kirner A, Giegling I, Kathmann N, Leinsinger G, Maag K, Hegerl U, Hahn K, Moller HJ. Association of an interleukin-1beta genetic polymorphism with altered brain structure in patients with schizophrenia. *AmJ Psychiatry*. 2001; 158 (8):1316–19.

Meltzer HY. What's atypical about atypical antipsychotic drugs? *Curr OpinPharmacol*. 2004; 4 (1): 53-57.

Meredith GE, Callen S, Scheuer DA. Brain Derived Neurotrophic factor expression is increased in the rat amygdale, piriform cortex and hypothalamus following repeated amphetamine administration. *Brain Res*.2002; 949 (1-2): 218-27

Miller AL, Hall CS, Buchanan RW, Buckley PF, Chiles JA, Conley RR, Crismon ML, Ereshefsky L, Essock SM, Finnerty M, Marder SR, Miller DD, McEvoy JP, Rush AJ, Saeed SA, Schooler NR, Shon SP, Stroup S, Tarin Godoy B. The Texas Medication Algorithm Project antipsychotic algorithm for schizophrenia. *J Clin Psychiatry*. 2004; 65 (4): 500-508.

Molteni R, Barnard RJ, Ying Z, Roberts FA, Gómez-Pinilla F. A high-fat, refined sugar diet reduces hippocampal. brain-derived neurotrophic factor, neuronal. plasticity and learning. *Neuroscience*. 2002; 112 (4): 803-814.

Morgan CJ, Mofeez BB, Bromley L, Curran HV. Acute effects of ketamine on memory systems and psychotic symptoms in healthy volunteers. *Neuropsychopharmacology*. 2004; 29 (1): 208-218.

Moreira JD, Knorr L, Thomazi AP, Simao F, Battu C, Osés JP, Gottfried C, Wofchuk S, Sabego C, Souza DO, Perry ML, Vinadé L. Dietary ômega-3 fatty acids attenuate cellular damage after a hippocampal ischemic insult in adult rats. *J Nutr Biochem*. 2010; 21 (4): 351-356.

Morrison AP, French P, Walford L, Lewis SW, Kilcommon A, Green J, Parker S, Bentall RP. Cognitive therapy for the prevention of psychosis in people at ultra-high risk: randomized controlled trial. *Br J Psychiatry*. 2004;185: 291-297.

Müller N, Schwarz MJ. Immune system and schizophrenia. *Curr Immunol Rev*. 2010;6 (3): 213-220.

Naudin J, Mege JL, Azorin JM, Dassa D. Elevated circulating

levels of IL-6 in schizophrenia. *Schizophr Res.* 1996; 20(3):269-273.

Nakazato M, Hashimoto K, Shimizu E, Kamakiri C, Kozumi H, Okamura N, Mtsuori, Komatsu N, Iyo M. Decreased levels of serum Brain- Derived Neutrophilic Factor Female Patients with Eating Disorders. *Biol Psychiatry.* 2003; 54 (4): 485-490.

Ng F, Berk M, Dean O, Bush AI. Oxidative stress in psychiatric disorders: evidence base and therapeutic implications. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2008; 11(6): 851-876.

Nishimoto T, Kadoyama K, Taniguchi T, Takano M, Otani M, Nakamura-Hirota T, Lu Y, Matsumoto A, Matsuyama S. Synaptotagmin1 synthesis induced by synaptic plasticity in mouse hippocampus through activation of nicotinic acetylcholine receptors. *Neurosci Lett.* 2011; 489 (1):25-29.

Olney JW, Farber NB. Glutamate receptor dysfunction and schizophrenia. *Arch Gen Psy.*1995; 52 (12): 998-1007.

Othmen LB, Mechri A, Fendri C, Bost M, Chazot G, Gaha L, Kerkeni A. Altered antioxidant defense system in clinically stable patients with schizophrenia and their unaffected siblings. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2008; 32 (1): 155-159.

Parent MJ, Bedard MA, Aliaga A, Minuzzi L, Mechawar N, Soucy JP, Schirrmacher E, Kostikov A, Gauthier SG, Rosa-Neto P. Cholinergic Depletion in Alzheimer's Disease Shown by. *Int J Mol Imaging.* 2013;20 (13):205-245

Peet M, Brind J, Ramchand CN, Shah S, Vankar GK. Two double-blind placebo-controlled pilot studies of eicosapentaenoic acid in the treatment of schizophrenia. *Schizophr Res.* 2001; 49(3): 243-51.

Peet M, Stokes C. Omega 3 fatty acids in the treatment of psychiatric disorders. *Drugs.* 2005; 65 (8): 1051-1059.

Peet, M. The metabolic syndrome, omega-3 fatty acids and inflammatory processes in relation to schizophrenia. *Prostaglandins, LeukotEssent Fatty Acids.* 2006; 75 (4-5):323-327.

Peet M. Omega-3 polyunsaturated fatty acids in the treatment of schizophrenia. *IsrJ Psychiatry Relat Sci.* 2008; 45(1): 19-25.

Petronijević ND, Mičić DV, Durčić B, Marinković D, Paunović VR. Substrate kinetics of erythrocyte membrane Na-K-ATPase and lipid peroxides in schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2003; 27(3): 431-440.

Piomelli D, Pilon C, Giros B, Sokoloff P, Martres MP, Schwartz JC. Dopamine activation of the arachidonic acid cascade as a basis for D1/D2 receptor synergism. *Nature.* 1991; 353 (6340): 164-167.

Potvin S, Stip E, Sepehry AA, Gendron A, Bah R, Kouassi E. Inflammatory cytokine alterations in schizophrenia: a systematic quantitative review. *Biol Psychiatry*. 2008;63 (8):801-808.

Radka SF, Holst PA, Fristsch M, Atlar CA. Presence of Brain-derived neurotrophic factor in brain and human and rat but not mouse serum detected by a sensitive and specific immunoassay. *Brain Res*. 1996; 709 (1): 122-130

Radonjic NV, Petronijevi ND, Vučković SM, Prostran MS, Nešić ZI, Todorović VR, Paunović VR. Baseline temperature in an animal model of schizophrenia: long-term effects of perinatal phencyclidine administration. *PhysiolBehav*. 2008; 93 (3): 437-443.

Rang HP, Dale MM, Ritter MJ. *Farmacologia*. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

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 (3):460–466.

Ribeiz SR, Bassitt DP, Arrais JA, Avila R, Steffens DC, Bottino CM. Cholinesterase inhibitors as adjunctive therapy in patients with schizophrenia and schizoaffective disorder: a review and meta-analysis of the literature. *CNS Drugs*. 2010; 24(4):303-317.

Schwarz MJ, Riedel M, Ackenheil M, Müller N. Decreased levels of soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1) in unmedicated and medicated schizophrenic patients. *Biol Psychiatry*. 2000;47 (1):29-33.

Schwieler L, Erhardt S, Erhardt C, Engberg G. Prostaglandin-mediated control of rat brain kynurenic acid synthesis--opposite actions by COX-1 and COX-2 isoforms. *J Neural Transm*. 2005;112 (7):863–872.

Seeman P, Chau-Wong M, Tedesco J, Wong K. Brain receptors for antipsychotic drugs and dopamine: direct binding assays. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1975; 72(11): 4376-4380.

Singh B, Bera NK, Nayak CR, Chaudhuri TK. Decreased serum levels of interleukin-2 and interleukin-6 in Indian Bengalee schizophrenic patients. *Cytokine*. 2009; 47(1):1-5.

Smith GS, Schloesser R, Brodie JD, Dewey SL, Logan J, Vitkun SA, Simkowitz P, Hurley A, Cooper T, Volkow ND, Cancro R. Glutamate modulation of dopamine measured in vivo with positron emission tomography (PET) and C-11 raclopride in normal human subjects. *Neuropsychopharmacol*. 1998;18: 18-25.

Stone JM, Morrison PD, Pilowsky LS. Glutamate and dopamine dysregulation in schizophrenia: a synthesis and selective review. *J Psychopharmacol.* 2007; 21 (4): 440-452.

Strous RD, Shoenfeld Y. Schizophrenia, autoimmunity and immune system dysregulation: a comprehensive model updated and revisited. *J Autoimmun.* 2006; 27(2):71-80.

Sugimoto H, Ogura H, Arai Y, Limura Y, Yamanishi Y. Research and development of donepezil hydrochloride, a new type of acetylcholinesterase inhibitor. *Jpn J Pharmacol.* 2002; 89 (1):7-20.

Talbot PS, Laruelle M. The role of in vivo imaging with PET and SPECT in the elucidation of psychiatry drug action and new drug development. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2002; 12: 503-511.

Tandon R. Antipsychotic treatment of schizophrenia: two steps forward, one step back. *Curr Psychiatry Rep.* 2007; 9 (4): 263-264.

Tomiya M, Fukushima T, Kawai J, Aoyama C, Mitsunashi S, Santa T, Imai K, Toyo'oka T. Alterations of plasma and cerebrospinal fluid glutamate levels in rats treated with the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, ketamine. *Biomed Chromatogr.* 2006; 20(6-7): 628-633.

Vallone D, Picetti R, Borrelli E. Structure and function of dopamine receptors. *Neurosci Biobehav Rev.* 2000; 24(1):125-132.

Vasconcelos SMM, Andrade MM, Soares PM, Chaves BG, Patrocínio MCA, Sousa FCF, Macêdo DS. Cetamina: aspectos gerais e relação com a esquizofrenia. *Rev Psiquiatr Clín.* 2005; 32 (1):10-16.

Verde, SMML. Impacto do tratamento quimioterápico no estado nutricional e no comportamento alimentar de pacientes com neoplasia mamária e suas consequências na qualidade de vida. [Dissertação de Mestrado]. Programa de Pós Graduação em Saúde Pública. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2007.

Volchegorrskii A , Mester NV. The influence of 3-oxypiridine antioxidants on depression in patients with diabetes mellitus. *Klin Med(Mosk).* 2007; 85(2): 40-45.

Vollenweider F. Effects of (S)-ketamine on striatal dopamine: a raclopride PET study of a model psychosis in humans. *J Psychiatr Res.* 2000; 34 (1):35-43.

Voss B, Thienel R, Leucht S, Kircher T. Therapy of cognitive deficits in schizophrenia with acetylcholinesterase inhibitors. A systematic overview. *Nervenarzt.* 2008; 79 (1),47-48.

Wendel A. Glutathione peroxidase. *Methods in enzymology.* 1981; 77: 325-33.

World Federation of Societies of Biological Psychiatry (WFSBP) guidelines for biological treatment of schizophrenia, Part 1: acute treatment of schizophrenia. *World J Biol Psychiatry*. 2012; 6: 132-191.

Yamamoto H, Gurney ME. Human platelets contain brain-derived neurotrophic factor. *J Neurosci*. 1990; 10 (11): 3469-3478.

Yao JK, Keshavan MS. Antioxidants, redox signaling, and pathophysiology in schizophrenia: an integrative view. *Antioxid Redox Signal*. 2011; 15(7): 2011-2035.

Young J, McKinney SB, Ross BM, Wahle KW, Boyle SP. Biomarkers of oxidative stress in schizophrenic and control subjects. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2007; 76(2): 73-85.

Zhang XY, Tan YL, Cao LY, Wu GY, Xu Q, Shen Y, Zhou DF. Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in different forms of schizophrenia treated with typical and atypical antipsychotics. *Schizophr Res*. 2006; 81(2-3): 291-300.

Zhang XY, Chen Da C, Xiu MH, Wang F, Qi LY, Sun HQ, Chen S, He SC, Wu GY, Haile CN, Kosten TA, Lu L, Kosten TR. The novel oxidative stress marker thioredoxin is increased in first-episode schizophrenic patients. *Schizophr Res*. 2009; 113 (2-3): 151-157.

Zugno AI, Julião RF, Budni J, Volpato AM, Fraga DB, Pacheco FD, Deroza PF, Luca RD, DeOliveira MB, Heylmann AS, Quevedo J. Rivastigmine reverses cognitive deficit and acetylcholinesterase activity induced by ketamine in an animal model of schizophrenia. *Metab Brain Dis*. 2013; 28(3): 501-508.