

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

LUANA BOEIRA ROCHA

**EFEITO DO ÁCIDO FÓLICO SOBRE O METABOLISMO
ENERGÉTICO NO MODELO ANIMAL DE ESQUIZOFRENIA
INDUZIDO POR CETAMINA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Alexandra Ioppi Zugno

**CRICIÚMA
2015**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

R672e Rocha, Luana Boeira.

Efeito do ácido fólico sobre o metabolismo energético no modelo animal de esquizofrenia induzido por cetamina / Luana Boeira Rocha ; orientadora: Alexandra Ioppi Zugno. – Criciúma, SC : Ed. do Autor, 2015.

74 p : il. ; 21 cm.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, SC, 2015.

1. Esquizofrenia - Tratamento. 2. Cetamina. 3. Ácido fólico. 4. Creatina quinase. 5. Metabolismo energético. I. Título.

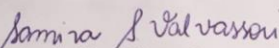
CDD. 22^a ed. 615.1

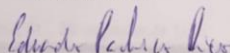
PARECER

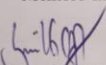
Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado) reuniram-se para realizar a arguição da Dissertação de MESTRADO apresentada pela candidata **Luana Bocira Rocha** sob o título “Efeitos da exposição á fumaça de cigarro sobre o processo autofágico em aorta de camundongos Swiss”, para obtenção do grau de MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE do Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

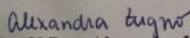
Após haver analisado o referido trabalho e argüido a candidata, os membros são de parecer pela “**APROVAÇÃO**” da Dissertação, com conceito B.


Criciúma, SC, 29 de janeiro de 2015


Prof.ª Dra. Samira da Silva Valvassori
Membro Relator


Prof. Dr. Eduardo Pacheco Rico
Membro Interno


Prof. Dr. Gullhian Leipnitz
Membro Externo


Prof.ª Dra. Alexandra Ioppi Zugno
Orientadora


Prof. Dr. Claudio Teodoro de Souza
Coordenador do PPGCS

FOLHA INFORMATIVA

Esta dissertação foi elaborada segundo o estilo Vancouver e será apresentada no formato tradicional conforme normas constantes na Resolução nº 02/2013, propostas pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

Este trabalho foi realizado nas instalações do laboratório de Neurociências e do Laboratório de Neurotoxicologia do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense

Ao meu pai, Amilton Rocha, e à
minha mãe, Isis, que me educaram com amor
incondicional e me ensinaram a ter coragem
para caminhar em busca de meus objetivos.
Vocês são parte de todas as minhas
conquistas..

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Amilton Rocha e Isis, todo esforço e amor dedicados a minha criação.

Ao meu irmão, Renan Rocha, por representar um grande exemplo e inspiração na busca de meus objetivos.

A minha amiga, Ana Maria Volpato, por estar ao meu lado em todas as horas.

Ao professor João Quevedo, o qual foi um grande incentivador deste trabalho.

A minha orientadora, Alexandra Zugno, e aos colegas do laboratório de Neurociências, pelo apoio, incentivo e auxílio durante a execução e conclusão deste trabalho.

“Se vi mais longe foi por estar de pé sobre ombros de gigantes.”

Isaac Newton

RESUMO

A esquizofrenia é um transtorno psiquiátrico crônico e incapacitante que afeta aproximadamente 1% da população mundial. Pesquisas com tratamentos preventivos se tornam necessárias, incluindo o uso de nutrientes, como o ácido fólico cujo metabolismo está implicado no desenvolvimento do transtorno. No presente estudo foi avaliado o efeito do ácido fólico sobre os parâmetros de metabolismo energético em ratos submetidos ao modelo de esquizofrenia induzido pela administração de cetamina. Ratos Wistar adultos foram suplementados durante 14 dias com ácido fólico (5, 10 ou 50mg/kg) ou água via oral e a partir do 9º dia de experimento foi administrada cetamina (25mg/kg) ou salina via intraperitoneal durante 7 dias. No 15º dia do experimento, os animais foram mortos por decapitação e as estruturas cerebrais, córtex frontal, hipocampo e estriado, dissecadas para as análises bioquímicas. Foi avaliada a atividade dos complexos I, II, II-III e IV da cadeia respiratória mitocondrial e da enzima creatina quinase. Nossos achados, de modo geral, indicaram que a administração repetida de cetamina não foi capaz de alterar os parâmetros analisados. No complexo I, o ácido fólico (10mg/kg) associado à cetamina reduziu a atividade deste complexo em relação ao grupo controle no córtex frontal, hipocampo e estriado. Além disso, o ácido fólico (10mg/kg) por se diminuiu a atividade do complexo I no hipocampo e no estriado quando comparado ao grupo controle. O ácido fólico (50mg/kg) associado à cetamina aumentou a atividade do complexo I em relação ao grupo controle no estriado. No complexo II, o ácido fólico (5mg/kg) em associação com a cetamina elevou a atividade deste complexo apenas no córtex frontal. Ainda houve um aumento na atividade do complexo II-III no hipocampo pelo ácido fólico (5mg/kg) associado à cetamina em relação ao grupo controle. Observou-se no complexo IV, apenas no estriado, um efeito do ácido fólico (5mg/kg) por se aumentando a atividade deste complexo comparado ao grupo controle. A administração de ácido fólico (10mg/kg e 50mg/kg) por se aumentou significativamente a atividade da creatina quinase no córtex frontal. Sabe-se o importante papel que o ácido fólico desempenha na fisiopatologia da esquizofrenia, porém o mecanismo exato pelo qual esta relação ocorre permanece desconhecido. Dessa forma, estudos adicionais baseados em modelos animais de esquizofrenia devem ser realizados, visando uma maior compreensão das propriedades terapêuticas e profiláticas do ácido

fólico, bem como a dose mais adequada e o melhor tempo de tratamento neste transtorno.

Palavras-chave: Ácido fólico, cetamina, enzima creatina quinase, esquizofrenia, metabolismo energético, modelo animal.

ABSTRACT

Schizophrenia is a chronic and disabling psychiatric disorder that affects approximately 1% of the population. Searches for preventive treatments become necessary, including the use of nutrients such as folic acid whose metabolism is implicated in the development of the disorder. In the present study we evaluated the effect of folic acid on the energy metabolism parameters in adult Wistar rats subjected to the schizophrenia model induced by administration of ketamine. Adult Wistar rats were supplemented for 14 days with folic acid (5, 10 or 50mg/kg) or water orally and from the 9th day of the experiment was administered ketamine (25mg/kg) or saline intraperitoneally for 7 days. On the 15th day of the experiment, the animals were killed by decapitation and the brain structures, frontal cortex, hippocampus and striatum dissected for biochemical analysis. The activity of complex I, II, III-III and IV in the mitochondrial respiratory chain, and creatine kinase was assessed. Our findings, in general showed that repeated administration of ketamine were not able to alter the parameters analyzed. In the complex I, folic acid (10mg/kg) associated with ketamine reduced the activity of this complex compared to the control group in the frontal cortex, hippocampus and striatum. Furthermore, folic acid (10mg/kg) per se decreased activity of complex I in the hippocampus and striatum compared to the control group. Finally, folic acid (50mg/kg) associated with ketamine had increased complex I activity compared to the control group in the striatum. Regarding complex II, folic acid (5mg/kg) in combination with ketamine increased the activity of this complex, only in the frontal cortex. There was also found an increase in the activity of complex II-III in the hippocampus by folic acid (5mg/kg) associated with ketamine compared to the control group. It was observed in the complex IV, only in the striatum, an effect of folic acid (5mg/kg) per se increasing the activity of this complex compared to the control group. Administration of folic acid (10mg/kg and 50mg/kg) per se significantly increased creatine kinase activity in the frontal cortex. It is known the important role of folic acid in the pathophysiology of schizophrenia, however, the exact mechanism by which this relationship occurs remains unknown. Thus, additional studies based on animal models of schizophrenia should be performed, aiming to a better understanding of therapeutic and prophylactic properties of folic acid, as well as the most appropriate dose and the best time of treatment in this disorder.

Keyword: Folic acid, ketamine, enzyme creatine kinase, schizophrenia, energy metabolism, animal model.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: O receptor NMDA é voltagem-dependente.....	32
Figura 2: Na maioria dos tecidos, a remetilação da homocisteína é catalisada pela metionina sintetase com o 5 metiltetrahidrofolato atuando como doador de grupo metil.....	37
Figura 3: Desenho experimental.....	42
Figura 4: Atividade do complexo I no córtex frontal, hipocampo e estriado de ratos <i>Wistar</i> suplementados com ácido fólico (5, 10 ou 50mg/kg) e submetidos ao modelo animal de esquizofrenia induzido por cetamina (25mg/kg).....	45
Figura 5: Atividade do complexo II no córtex frontal, hipocampo e estriado de ratos <i>Wistar</i> suplementados com ácido fólico (5, 10 ou 50mg/kg) e submetidos ao modelo animal de esquizofrenia induzido por cetamina (25mg/kg).....	46
Figura 6: Atividade do complexo II-III no córtex frontal, hipocampo e estriado de ratos <i>Wistar</i> suplementados com ácido fólico (5, 10 ou 50mg/kg) e submetidos ao modelo animal de esquizofrenia induzido por cetamina (25mg/kg).....	46
Figura 7: Atividade do complexo IV no córtex frontal, hipocampo e estriado de ratos <i>Wistar</i> suplementados com ácido fólico (5, 10 ou 50mg/kg) e submetidos ao modelo animal de esquizofrenia induzido por cetamina (25mg/kg).....	47
Figura 8: Atividade da creatina quinase no córtex frontal, hipocampo e estriado de ratos <i>Wistar</i> suplementados com ácido fólico (5, 10 ou 50mg/kg) e submetidos ao modelo animal de esquizofrenia induzido por cetamina (25mg/kg).....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Divisão dos grupos experimentais.....	41
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

APA – Associação Americana Psicológica (do inglês American Psychological Association)

ADP – Adenosina Di-Fosfato (do inglês adenosine Diphosphate)

ATP – Trifosfato de adenosina (do inglês adenosine triphosphate)

AMPA - Ácido α -amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico

ANOVA - Análise de Variância de Uma Via

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BSA – Albumina bovina sérica (do inglês bovine serum albumin)

CK – Creatina quinase (do inglês creatine kinase)

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

DCIP – 2,6-dicloroindofenol

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

DSM-V - Manual de Diagnóstico e Estatística dos Transtornos Mentais 5ª Edição

E.P.M – Erro Padrão da Média

MTFR - Metilenotetrahidrofolato Redutase

NADPH – Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato (do inglês nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)

NMDA - N-Metil-D-Aspartato

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

RNA – Ácido Ribonucléico

RNA_m – Ácido Ribonucléico Mensageiro

SBNeC - Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento

SNC - Sistema Nervoso Central

SPSS – do inglês Statistical Package for the Social Science

UNESC – Universidade do Extremo Sul Catarinense

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	29
1.1 ESQUIZOFRENIA	29
1.2 ESQUIZOFRENIA E SISTEMA GLUTAMATÉRGICO.....	33
1.3 ESQUIZOFRENIA E DISFUNÇÃO MITOCONDRIAL	34
1.4 ÁCIDO FÓLICO	36
1.5 ÁCIDO FÓLICO E ESQUIZOFRENIA	38
2. OBJETIVOS	40
2.1 OBJETIVO GERAL	40
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
3 METODOLOGIA	41
3.1 ANIMAIS.....	41
3.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL (PREVENÇÃO).....	42
3.3 ANÁLISES BIOQUÍMICAS	43
3.3.1 Atividade da Cadeia Respiratória Mitocondrial	43
3.3.2 Atividade da Creatina Quinase (CK)	44
3.4 DOSAGEM DE PROTEÍNAS	44
3.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	44
4.RESULTADOS	45
5 DISCUSSÃO	48
6 CONCLUSÃO	53
REFERÊNCIAS	54

1 INTRODUÇÃO

1.1 ESQUIZOFRENIA

A esquizofrenia é um transtorno psiquiátrico crônico e grave causado por profundo prejuízo nas funções mentais, emoção e comportamento. É caracterizado pela presença de delírios, alucinações, apatia, comportamento antissocial e déficit cognitivo, rompendo os processos mais básicos de percepção e julgamento de um indivíduo (Schultz et al., 2007; Meyer e Feldon, 2010; Pickard, 2011). Este transtorno psicótico afeta aproximadamente 1% da população mundial (APA, 1994; Tamminga e Holcomb, 2005; Ross et al., 2006; Perala et al., 2007). Já a incidência em indivíduos com irmão esquizofrênico varia entre 8 a 10%; em pessoas cujos pais são esquizofrênicos 12% e em gêmeos idênticos em torno de 40 a 50% (Tamminga e Holcomb, 2005). No Brasil, estudos demonstram que pacientes esquizofrênicos ocupam cerca de 30% dos leitos hospitalares, correspondendo portanto, a segunda causa mais frequente para as primeiras consultas psiquiátricas ambulatoriais. A esquizofrenia é um dos mais debilitantes transtornos psiquiátricos que devasta as relações sociais, familiares, laborais e acadêmicas em aproximadamente 20 milhões de pessoas que apresentam os sintomas (APA, 1994).

As manifestações da esquizofrenia tipicamente surgem entre o final da adolescência e o início da vida adulta e podem variar de acordo com a susceptibilidade do indivíduo. Desta forma, o transtorno pode evoluir de forma progressiva para a cronicidade, ou pode exacerbar-se durante o curso da mesma (Graeff e Brandão, 1999). Na maioria dos pacientes o início é caracterizado por uma mudança abrupta no perfil social e afetivo (APA, 1994; Weiden et al., 2007). O diagnóstico do transtorno baseia-se essencialmente nos sinais e sintomas. De acordo com o DSM-V (Manual de Diagnóstico e Estatística dos Transtornos Mentais) os sintomas da esquizofrenia podem ser classificados como: positivos (alucinações, delírios, agitação psicomotora e desconfianças), negativos (embotamento afetivo, isolamento social, falta de iniciativa, falta de prazer, discurso empobrecido e desorganizado) e sintomas cognitivos (prejuízo de memória, aprendizagem e déficit de pensamento, afeto inapropriado) (APA, 1994).

A origem do transtorno é multifatorial e o histórico familiar é o fator de risco mais significativo. Outros fatores podem contribuir para o desenvolvimento da esquizofrenia como: nascimento em meio urbano

e/ou no inverno, idade paterna avançada, infecção pré-natal, desnutrição pré-natal e perinatal, estresse materno, complicações obstétricas, status socioeconômico, entre outros (Shultz, 2007; McGrath e Susser, 2009; Meyer e Feldon, 2010). Sabe-se que há uma grande contribuição genética para o desencadeamento do transtorno, porém quando todos estes fatores ou a maioria deles ocorrem juntos, o risco para desenvolver esquizofrenia pode ser multiplicativo (Tamminga e Holcomb, 2005; Meyer e Feldon, 2010).

Muitos fármacos estão disponíveis no mercado para o tratamento da esquizofrenia destacando-se os antipsicóticos típicos (primeira geração) e atípicos (segunda geração). Este arsenal terapêutico para a esquizofrenia surgiu na segunda metade do século passado, quando, primeiramente surgiram os fármacos de primeira geração com os quais os pacientes apresentavam diversos efeitos colaterais e, portanto, baixa aderência ao tratamento (Tajima et al., 2009; Kane e Corell, 2010; Leucht et al., 2011). Posteriormente, a introdução dos antipsicóticos atípicos no mercado farmacêutico gerou expectativas de maior aderência ao tratamento pelos pacientes, uma vez que estes medicamentos ofereciam maiores vantagens em relação aos antipsicóticos típicos. Tais vantagens incluíam melhora dos sintomas negativos, déficit cognitivo, capacidade funcional, prevenção das recaídas e melhora do grau dos sintomas extrapiramidais e discinesia tardia. Contudo, outros efeitos adversos dos antipsicóticos atípicos, como ganho de peso, hiperglicemia e dislipidemia foram relatados (Shultz et al., 2007; Tajima et al., 2009; Leucht et al., 2011). Além disso, estudos epidemiológicos mostraram que a não aderência ao tratamento com estes continuou semelhante à adesão ao tratamento com fármacos de primeira geração (Dolder et al., 2002; Gilmer et al., 2004; Valenstein et al., 2004). Tendo em vista os efeitos colaterais provocados pelos antipsicóticos e a baixa aderência pelos pacientes, o tratamento para a esquizofrenia permanece distante do ideal e, portanto, o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas é claramente justificado.

A fisiopatologia completa do transtorno permanece desconhecida, porém, não há dúvidas da existência de alterações anatômicas e bioquímicas cerebrais em sua gênese (Keshavan et al., 2011). As hipóteses clássicas postulam que a esquizofrenia seria o resultado de uma alteração na função de um ou mais sistemas de neurotransmissores, incluindo os sistemas dopaminérgico, serotoninérgico, glutamatérgico e adenosinérgico (Miyamoto et al., 2003; Harrison e Weinberg, 2005; Lara et al., 2006; Boison et al., 2011; Pickard, 2011). Porém, estas hipóteses não conseguem explicar por completo o complexo mecanismo

desta patologia, o que tem levado ao estudo de novos mecanismos celulares que estariam envolvidos na esquizofrenia, tais como: disfunção mitocondrial (Rezin et al., 2009; Martin-de-Souza et al., 2011), anormalidades do metabolismo energético (Martin-de-Souza et al., 2011) e estresse oxidativo (Bitanhirwe e Woo, 2011). Outros sistemas de neurotransmissores também estão envolvidos na fisiopatologia deste transtorno, como o sistema GABAérgico (Volk et al., 2000; Vinkers et al., 2010) e o sistema colinérgico (Sarter et al., 2010; Brooks et al., 2011).

Apesar do crescente consenso de que a esquizofrenia é um transtorno neural, a etiologia, neuropatologia, fisiopatologia, psicofarmacologia e genética ainda não estão bem estabelecidos. Estes aspectos são muito explorados em humanos, mas a pesquisa básica em animais representa uma promissora ferramenta para estudar a base neurobiológica do distúrbio neural e comportamental relevante para a esquizofrenia, a fim de estabelecer e avaliar novas terapias farmacológicas para seu tratamento (Meyer e Feldon, 2010)

Entre os modelos animais farmacológicos de esquizofrenia destacam-se a administração de antagonistas não competitivos de receptores glutamatérgicos N-Metil D-Aspartato (NMDA), como a cetamina (De Oliveira et al., 2009; Canever et al., 2010; De Oliveira et al., 2011; Fraga et al., 2011); da fenciclidina (Hashimoto et al., 2007; Elsworth et al., 2011) e de MK-801 (Su et al., 2007; Boulay et al., 2010), os quais bloqueiam o poro do canal NMDA, impedindo o influxo de cálcio (Figura 1), podendo assim induzir um estado psicótico transitório e reversível que inclui sintomas positivos, negativos e cognitivos da esquizofrenia em indivíduos saudáveis (Javitt et al., 2000; Mechri et al., 2001).

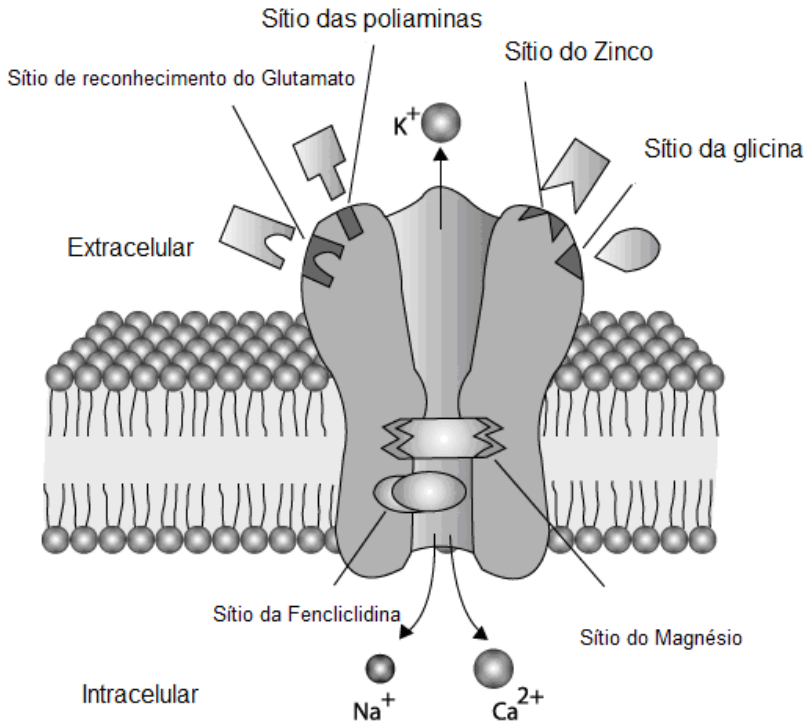


Figura 1: O receptor NMDA é voltagem-dependente. Quando em repouso é bloqueado por íons magnésio e zinco. O seu desbloqueio permite a entrada de cálcio e sódio e saída de potássio. Além disso, para ser ativado o receptor precisa da ligação simultânea de glutamato e d-serina ou glicina. Fonte – <http://www.frca.co.uk/>

Em roedores, estes antagonistas de receptores NMDA também induzem comportamentos anormais, incluindo hiperatividade, estereotipia, comportamento social alterado e déficit sensorio e cognitivo, característicos da esquizofrenia (Lipska e Weinberger, 2000). Nos modelos pré-clínicos a capacidade de reversão de tal efeito por substâncias em teste gera uma boa previsão de que estes compostos poderão apresentar atividade antipsicótica quando administrados em humanos (Geyer e Ellenbroek, 2003; Kapur e Mamo, 2003; Bubenková-Valesšová et al., 2008; Neill et al., 2010; Meltzer et al., 2011). Considerando os achados acima citados, o presente estudo

utilizou o modelo animal de esquizofrenia induzido por cetamina em ratos adultos.

1.2 ESQUIZOFRENIA E SISTEMA GLUTAMATÉRGICO

O glutamato é o aminoácido excitatório mais abundante do sistema nervoso central (SNC) (Davies et al., 1979; Watkins e Evans, 1981). Sua transmissão é mantida sob fino controle sendo imprescindível para funções fisiológicas como aprendizado, memória, cognição, efeitos neurotróficos, neurotóxicos e neuroplasticidade. Assim, alterações neste controle da transmissão glutamatérgica resultam em transtornos psiquiátricos, como a esquizofrenia (Javitt e Zukin, 1991; Javitt, 2010). A fim de explicar a participação do glutamato na fisiopatologia da esquizofrenia, duas teorias opostas foram propostas: a hipofunção glutamatérgica (Kim et al., 1980) e a hiperfunção glutamatérgica (Deakin et al., 1989).

A teoria da hipofunção glutamatérgica surgiu a partir de observações clínicas de pacientes que recebiam doses subanestésicas de fenciclidina ou cetamina, antagonistas dos receptores NMDA, que apresentavam sintomas psicóticos ou exacerbavam os sintomas positivos, negativos e cognitivos da esquizofrenia (Luby et al., 1959; Rosenbaum et al., 1959; Bakker e Amini, 1961; Krystal et al., 1994; Anand et al., 2000). Assim, esta teoria sugere que uma deficiência de receptores glutamatérgicos em áreas fronto-corticais, favorece uma ativação do sistema dopaminérgico mesolímbico e conseqüentemente o aparecimento de sintomas positivos e negativos da doença (Kim et al., 1980; Carlsson e Svensson, 1990; Ohno e Watanabe, 1995). Já a teoria da hiperfunção glutamatérgica sugere uma hipofunção de receptores NMDA no córtex temporal, a qual induz por meio de uma maior ativação de receptores Ácido α -amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico (AMPA), kainato e metabotrópicos, uma compensação do sistema glutamatérgico no córtex frontal. Estes processos neuroquímicos juntamente com a liberação de outros neurotransmissores como a dopamina culminam nos sintomas da esquizofrenia (Deakin et al., 1989; Deakin e Simpson, 1997; Simpson et al., 1998; Dursun e Deakin, 2001).

Levando em consideração as hipóteses glutamatérgicas para explicar a fisiopatologia da esquizofrenia, achados clínicos de imagem apontam que em regiões frontais do cérebro (córtex pré-frontal e tálamo) de pacientes esquizofrênicos, o glutamato encontra-se em níveis

diminuídos (Rüsch et al., 2008; Stone et al., 2009; Lutkenhoff et al., 2010; Shirayama et al., 2010) enquanto a glutamina apresenta-se aumentada (Théberge, 2002; Rüsch et al., 2008; Stone et al., 2009; Shirayama et al., 2010) quando comparado a indivíduos saudáveis. Estes achados reforçaram a noção de que uma disfunção glutamatérgica no córtex pré-frontal está envolvida na fisiopatologia deste transtorno psiquiátrico. Estudos de neuroimagem descrevem a hiperativação e hipoativação glutamatérgica no cérebro de pacientes esquizofrênicos comparado a pessoas saudáveis, e sugere que o cérebro destes pacientes está mais apropriadamente caracterizado por uma disfunção da circuitaria em vez de, simplesmente, aumento ou diminuição da atividade (Callicott et al., 2003; Marek et al., 2010). Isso pode refletir num mecanismo bastante complexo na esquizofrenia, tal como alteração na atividade sináptica, funcionamento anormal de receptores glutamatérgicos e do ciclo glutamato-glutamina e disfunção dos transportadores glutamatérgicos (Marsman et al., 2011). Neste contexto, o mecanismo glutamatérgico da esquizofrenia ainda não está claro, exigindo estudos adicionais para a elucidação do mesmo.

1.3 ESQUIZOFRENIA E DISFUNÇÃO MITOCONDRIAL

Sabe-se que os neurônios são altamente dependentes da adenosina trifosfato (ATP) mitocondrial para a manutenção de suas funções fisiológicas. O cálcio (Ca^{2+}) intracelular regulado pelas mitocôndrias é fundamental para a geração de potenciais de ação em processos de sinalização, de transmissão sináptica, da dinâmica do citoesqueleto e da regulação da expressão gênica (Werth e Thayer, 1994; Mattson e Liu, 2003; Ivannikov et al., 2010). Tendo isto em vista, uma disfunção mitocondrial pode acarretar diferentes transtornos psiquiátricos, com ênfase para a esquizofrenia (Clay et al., 2011).

Focando no sistema de fosforilação oxidativa e, conseqüentemente, abordando os complexos mitocondriais, estudos em cérebro post mortem de pacientes esquizofrênicos revelaram alterações na atividade da citocromo c oxidase (complexo IV), succinato desidrogenase (complexo II) e NADH-citocromo c redutase (complexos I-III) (Cavelier et al., 1995; Maurer e Moller, 1997; Prince et al., 1999; Whatley et al., 1998). Em conjunto, estes achados sugerem um funcionamento anormal dos complexos mitocondriais da cadeia respiratória na esquizofrenia, sendo que estas alterações mitocondriais podem não ser uniformes dependendo da região cerebral avaliada ou do

tipo de célula estudada (Belogradov e Hatefi, 1994; Cavelier et al., 1995; Prince et al., 1999; Dror et al., 2002; Prabakaran et al., 2004; Mehler-Wex et al., 2006). Pesquisas mostraram que a atividade e expressão de subunidades do complexo I, desempenha um papel importante no controle da fosforilação oxidativa na mitocôndria (Davey et al., 1998), estando aumentadas em plaquetas de pacientes esquizofrênicos (Ben-Shachar et al., 1999; Dror et al., 2002). Foi demonstrado também que o grau de aumento na atividade do complexo I está diretamente relacionado à gravidade dos sintomas positivos da esquizofrenia (Dror et al., 2002). Além disso, no córtex parieto-occipital de pacientes esquizofrênicos verificou-se um aumento no nível de RNA mensageiro (RNAm) para genes que codificam subunidades que constituem o complexo I (Karry et al., 2004). Em contraste, outro estudo da literatura, mostrou que muitas subunidades do complexo I (NDUFB5, NDUFB9, NDUFS3, NDUFS6 e NDUFV2) estão downreguladas em muitas regiões cerebrais, principalmente no lobo anterior temporal (Martin-de-Souza et al., 2009). Ainda, estudos clínicos mostram um comprometimento do complexo I mitocondrial da cadeia respiratória em sangue periférico de pacientes esquizofrênicos (Ben-Schachar et al., 2007; Taurines et al., 2010; Rosenfeld et al., 2011).

Além das pesquisas clínicas, estudos pré-clínicos corroboram com os achados acima. Ji et al. (2009) mostrou uma expressão diminuída do RNAm (mas não de proteínas) da subunidade NDUFV2 do complexo I em ratos tratados com clozapina e quetiapina, dois fármacos antipsicóticos. Outros estudos pré-clínicos sugerem o comprometimento, em especial do complexo I, na fisiopatologia da esquizofrenia (Prince et al., 1997; Ben-Shachar et al., 2009). Segundo De Oliveira et al. (2011) a administração de doses sub-anestésicas de cetamina no modelo animal de esquizofrenia, induziu alteração na atividade dos complexos mitocondriais em cérebro de ratos, sugerindo que disfunções mitocondriais podem estar envolvidas na fisiopatologia deste transtorno.

Além de alterações mitocondriais, anormalidades em outros parâmetros do metabolismo energético têm sido observadas na esquizofrenia, como por exemplo, alterações no funcionamento da enzima creatina quinase (CK). Esta enzima está envolvida na estocagem de fosfatos de alta energia produzidos pela mitocôndria, ou seja, catalisa a transferência reversível do grupo N-fosforil da fosfocreatina para a Adenosina Di-Fosfato (ADP), regenerando o ATP (Pilla et al., 2003). Assim, uma diminuição na produção de ATP, pode levar a uma redução

na atividade ou expressão desta enzima (Wyss e Kaddurah-Daouk, 2000; Pilla et al., 2003).

Neste sentido, Burbaeva et al. (2003), verificou uma diminuição da CK em tecido cerebral post mortem de pacientes esquizofrênicos, sugerindo que esta diminuição pode estar associada à disfunção energética cerebral presente na esquizofrenia. Uma questão a ser considerada neste estudo é que o uso de neurolépticos pelos pacientes pode ter influenciado nos resultados. Volz et al. (1997) demonstrou que os níveis de fosfocreatina e ATP estavam aumentados no lobo frontal de pacientes esquizofrênicos que usavam neurolépticos comparado ao grupo controle. Desta forma, tais achados indicam que o tratamento com neurolépticos também pode influenciar na atividade da enzima.

Uma análise proteômica realizada por Deng et al. (2011), em um modelo animal de esquizofrenia induzido por ativação do sistema imune no período pré-natal em camundongos, mostrou que há uma upregulation do RNAm que codifica a enzima CK. Estes resultados assemelham-se aos achados de Clark et al. (2006) no córtex cingulado anterior post mortem de pacientes esquizofrênicos. Além disso, um estudo pré-clínico mostrou que o modelo animal de esquizofrenia induzido por cetamina aumentou a atividade da CK no córtex frontal, cerebelo, estriado e hipocampo de ratos Wistar (Canever et al., 2010).

De modo geral, estes achados suportam a ideia de que o metabolismo energético cerebral pode estar alterado em estruturas cerebrais de pacientes esquizofrênicos. Portanto, sugere-se que novas substâncias que tenham ação neste sistema, possam ser futuramente utilizadas na clínica para o tratamento da esquizofrenia.

1.4 ÁCIDO FÓLICO

O ácido fólico é uma vitamina do complexo B e age como um cofator de enzimas que participam do metabolismo de compostos de um carbono (1C) (Mattson e Shea, 2003; Coppen e Boulanger-Gouaille, 2005). A sua forma bioativa é o tetrahidrofolato (TH4); por adição de grupos metilas ao ácido fólico pela enzima dihidrofolato redutase e consequentemente a reação de adição de mais unidades de carbono produz a forma monoglutamil 5-metiltetrahidrofolato (ácido folínico), forma predominante na corrente sanguínea (Mattson e Shea, 2003) (Figura 2).

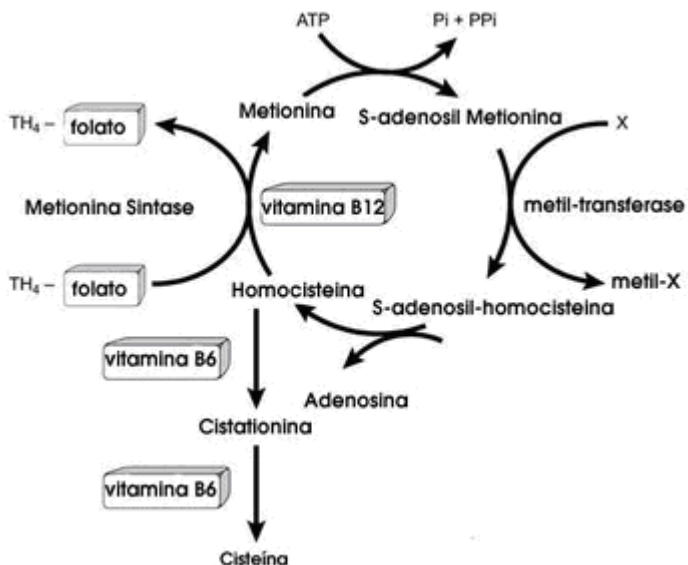


Figura 2: Na maioria dos tecidos, a remetilação da homocisteína é catalisada pela metionina sintetase com o 5 metiltetrahydrofolato atuando como doador de grupo metil. A formação desse doador depende da presença do 5,10-metilenotetrahydrofolato (derivado do folato da dieta) e da enzima 5,10-metilenotetrahydrofolato redutase (MTHFR). Fonte – www.moodle.ufba.br

O ácido fólico desempenha várias funções no organismo: a) remetila a homocisteína, um aminoácido citotóxico em concentrações elevadas, em metionina; b) participa da biossíntese de nucleotídeos; c) previne defeitos no tubo neural durante o desenvolvimento do SNC (Mattson e Shea, 2003; Coppin e Boulanger-Gouaille, 2005); c) aumenta a biossíntese de tetrahydrobiopterina, a qual é coenzima da enzima tirosina hidroxilase, fundamental para a hidroxilação da tirosina na biossíntese de monoaminas e da triptofano hidroxilase para a síntese de serotonina (Stahl, 2007); d) possivelmente exerce um papel neuroprotetor em danos ao SNC, por promover reparo e crescimento neuronal (Iskandar et al., 2004; Budni et al., 2011). Esta vitamina está envolvida no funcionamento e metabolismo de muitas substâncias extremamente importantes para o SNC, incluindo: purinas, pirimidinas, ácido desoxirribonucléico (DNA), ácido ribonucléico (RNA), aminoácidos, compostos fosfatados, vitamina B12, metionina, S-

adenosilmetionina, dopamina, adrenalina, noradrenalina e serotonina (Matson e Shea, 2003; Coppen e Bolander-Gouaille, 2005; Kronenberg et al., 2009; Lucock, 2011). Neste sentido, alterações no metabolismo do ácido fólico podem afetar o SNC, uma vez que esta vitamina envolve o metabolismo dos compostos acima relacionados. Esta afirmação ainda é baseada no fato de que a deficiência de ácido fólico está associada a múltiplas condições psiquiátricas entre as quais se inclui a esquizofrenia (Coppen e Bolander-Gouaille, 2005; Stahl, 2007; Miller, 2008; Krebs et al., 2009).

1.5 ÁCIDO FÓLICO E ESQUIZOFRENIA

Vários estudos demonstram que pacientes acometidos por esquizofrenia apresentam baixos níveis de ácido fólico plasmático e eritrocitário (Susser et al., 1998; Muntjewerff et al., 2003; Goff et al., 2004), sendo estes baixos níveis correlacionados a gravidade dos sintomas negativos do transtorno (Goff et al., 2004). As concentrações de ácido fólico, em geral, são inversamente relacionadas aos sintomas negativos classificados conforme a Escala para Avaliação dos Sintomas Negativos (Scale for Assessment of Negative Symptoms) (Herrán et al., 1999; Goff et al., 2004). Adicionalmente, a suplementação com esta vitamina pode reduzir estes sintomas, sendo uma forma de prevenção e/ou uma terapia adjuvante para a população esquizofrênica (Godfrey et al., 1990; Mattson e Shea, 2003).

A relação entre deficiência de ácido fólico e esquizofrenia começou a ser descrita em meados de 1960 (Krebs et al., 2009). Carney (1990) estabeleceu que a incidência da deficiência de ácido fólico em pacientes esquizofrênicos era alta, em torno de 20%. Posteriormente, um estudo conduzido em 243 pacientes psiquiátricos mostrou que pacientes esquizofrênicos apresentavam deficiência eritrocitária de ácido fólico (Carney, 1990). Mais recentemente, García-Miss et al. (2010), suplementou pacientes esquizofrênicos com esta vitamina e verificou diminuição nos níveis de homocisteína e da resposta inflamatória. Um caso clínico, apontou que um adolescente de 13 anos de idade com sintomatologia de esquizofrenia e um agravamento progressivamente catatônico, apresentou deficiência de ácido fólico cerebral e elevados títulos de anticorpos que bloqueiam os receptores de ácido fólico, indicando que esta deficiência pode estar relacionada com a catatonia (Ho et al., 2010).

Além disso, pesquisas apontam que a deficiência pré-natal de certos micronutrientes, como o ácido fólico, pode desempenhar um papel importante na esquizofrenia (Brown et al., 1996; Susser et al., 1996; Hoek et al., 1998; McGrath et al., 2011), considerando que a deficiência desta vitamina no início da gravidez pode ser um fator de risco para a esquizofrenia nos respectivos filhos na idade adulta (Smits e Essed, 2001; Smits et al., 2004; McGrath et al., 2011). Sabe-se ainda, que após a gravidez, a mulher pode levar até 1 ano para restaurar os níveis normais de ácido fólico (Smith et al., 1983; Açkurt et al., 1995; Bruinse e Van Den Berg, 1995). Portanto, o risco de desenvolvimento da esquizofrenia torna-se elevado em crianças concebidas durante o período de restauração dos níveis de ácido fólico (Smits et al., 2004).

Apesar de muitas pesquisas relacionarem a deficiência de ácido fólico e a esquizofrenia, poucos estudos clínicos foram realizados utilizando a suplementação desta vitamina para testar seu potencial efeito benéfico em pacientes esquizofrênicos (Godfrey et al., 1990; Levine et al., 2006). Godfrey et al. (1990) mostrou que a suplementação com metilfolato (15mg/dia, durante 6 meses) em pacientes esquizofrênicos significativamente melhorou a recuperação clínica e social destes indivíduos. Levine et al. (2006) demonstrou que a suplementação de ácido fólico e vitamina B12 durante 3 meses significativamente reduziu os escores da Escala de Síndrome Positiva e Negativa (Positive and Negative Syndrome Scale) do transtorno.

Além dos achados citados anteriormente, sabe-se que o polimorfismo de uma importante enzima, a metileno-tetra-hidrofolato redutase (MTHFR), pode também estar associada ao metabolismo do ácido fólico e à esquizofrenia (Muntjewerff et al., 2005; Muntjewerff et al., 2006; Yoshimi et al., 2010). Relatos indicam que este polimorfismo está relacionado com a gravidade dos sintomas negativos em pacientes esquizofrênicos (Roffman et al., 2008). No entanto, recente estudo contradiz esta ideia, reforçando o fato de que novos estudos devem ser desenvolvidos para esclarecer tal relação (García-Miss et al., 2010).

Embora muitas evidências relatem que o ácido fólico desempenha um importante papel na fisiopatologia da esquizofrenia, o exato mecanismo pelo qual esta relação acontece ainda não está claro. Além disso, estudos clínicos controlados e pré-clínicos baseados em modelos animais de esquizofrenia devem ser realizados visando o melhor entendimento das propriedades terapêuticas e profiláticas do ácido fólico, sua formulação apropriada, dose adequada e a duração ideal do tratamento.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da administração de ácido fólico sobre os parâmetros de metabolismo energético em ratos Wistar adultos submetidos ao modelo de esquizofrenia induzido pela administração de cetamina

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o efeito do ácido fólico sobre a atividade dos complexos I, II, II-III e IV da cadeia respiratória mitocondrial nas estruturas cerebrais, córtex frontal, hipocampo e estriado, de ratos Wistar submetidos ao modelo de esquizofrenia induzido por cetamina;

Avaliar o efeito do ácido fólico sobre a atividade da enzima creatina quinase nas estruturas cerebrais, córtex frontal, hipocampo e estriado, de ratos Wistar submetidos ao modelo de esquizofrenia induzido por cetamina.

3 METODOLOGIA

Os experimentos foram realizados na Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC) no Laboratório de Neurociências. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as recomendações internacionais para o cuidado e o uso de animais de Laboratório, além das recomendações para o uso de animais da Sociedade Brasileira de Neurociências e comportamento (SBNeC). Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais (CEUA) sob o protocolo 49/2012 (Anexo I) da UNESC. Todos os equipamentos, reagentes e fármacos necessários para a realização desta pesquisa estavam disponíveis ao proponente, não havendo critérios aparentes para suspensão ou encerramento da pesquisa.

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados 80 ratos Wistar machos adultos (60dias) pesando em média 250g a 300g, procedentes do Biotério da UNESC. Os animais foram mantidos em gaiolas com ciclos claro/escuro de 12h, alimentação e água disponível e ambiente climatizado com temperatura entre $22 \pm 1^\circ \text{C}$. Os animais foram divididos em 8 grupos de 10 animais cada, conforme tabela abaixo:

Tabela 1: Divisão dos grupos experimentais.

GRUPOS	
1.	Água+Salina ou Água+sal
2.	Ácido fólico (5mg/Kg)+Salina ou AF 5mg/Kg+sal
3.	Ácido fólico (10mg/Kg)+Salina ou AF 10mg/Kg+sal
4.	Ácido fólico (50mg/Kg)+Salina ou AF 50mg/Kg+sal
5.	Água+Cetamina (25mg/Kg) ou Água+CET
6.	Ácido fólico (5mg/Kg)+Cetamina (25mg/Kg) ou AF 5mg/Kg+CET
7.	Ácido fólico (10mg/Kg)+Cetamina (25mg/Kg) ou AF 10mg/Kg+CET
8.	Ácido fólico (50mg/Kg) +Cetamina (25mg/Kg) ou AF 50mg/Kg+CET

Fonte: Dados da pesquisadora, 2015.

3.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL (PREVENÇÃO)

Os animais foram suplementados por via oral (v.o.) com ácido fólico (5, 10 ou 50 mg/kg) ou água, uma vez ao dia durante 14 dias, sendo que entre os dias 9-15 do experimento receberam além do ácido fólico, a administração intraperitoneal (i.p.) de cetamina (25 mg/kg) ou salina por 7 dias. No 15º dia, 30 minutos após a última injeção de cetamina, os animais foram decapitados e as estruturas cerebrais, córtex frontal, hipocampo e estriado, dissecadas para posteriores análises bioquímicas. Abaixo segue desenho experimental (Figura 3).

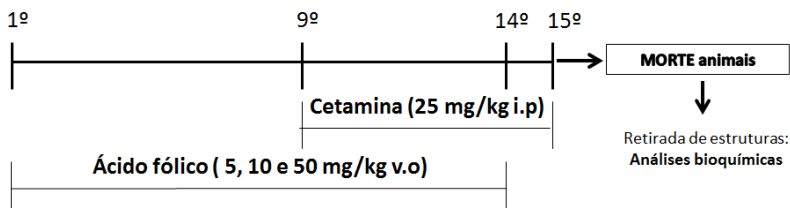


Figura 3: Desenho experimental – Fonte: Dados da pesquisadora, 2015.

As doses de ácido fólico (5, 10 ou 50 mg/kg) foram diluídas em 1ml de água. A cetamina, utilizada na dose de 25mg/kg, foi preparada em solução salina no volume de 1ml/100g (Becker e Grecksch, 2004; Imre et al., 2006; Tomiya e Fukushima, 2006; Canever et al., 2010). A administração de cetamina nesta dose é utilizada para mimetizar alguns sintomas psicóticos, tais como a hiperlocomoção e embotamento afetivo (Hunt e Raynaud; Garcia, 2006; Canever et al., 2010). Além disso, este anestésico é capaz de induzir estresse oxidativo e alterações mitocondrias no modelo animal proposto (De Oliveria et al., 2011). As doses foram administradas conforme respectivo peso de cada animal (1ml/kg).

Após a morte, os animais utilizados neste experimento foram descartados, acondicionados em saco branco leitoso e conduzidos ao freezer (conservação) da universidade. Posteriormente, foram coletados e transportados por empresa terceirizada. Os resíduos foram tratados fisicamente e em seguida encaminhados para disposição final em aterro sanitário. Estes procedimentos foram realizados conforme Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 306/2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

3.3 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

As estruturas cerebrais: córtex frontal, hipocampo e estriado, dos animais foram utilizadas para avaliar a atividade dos complexos I, II, II-III e IV da cadeia respiratória mitocondrial e a atividade da enzima creatina quinase (CK). Os métodos estão a seguir sumarizados.

3.3.1 Atividade da Cadeia Respiratória Mitocondrial

A atividade do complexo I foi determinada de acordo com Cassina e Radi (1996) pela leitura da taxa de NADH-dependente da redução do ferricianeto a 420 nm.

A atividade do complexo II foi avaliada pelo método descrito por Fischer e colaboradores (1985), onde o meio de incubação foi constituído de fosfato de potássio (40 mM, pH 7,4), succinato de sódio (16 mM) e 2,6-dicloroindofenol (DCIP) (8 mM). Inicialmente foram pré-incubados com 40-80 mg de proteínas do homogeneizado, a 30°C, durante 20 minutos. Depois, foram adicionados ao meio 4 mM de azida sódica e 7 mM de rotenona e a reação se iniciou com adição de 40 M de DCIP. As absorvâncias foram registradas durante 5 minutos, a 600 nm.

A atividade do complexo II-III foi determinada de acordo com Fischer et al. (1985), em que o meio de reação, constituído de fosfato de potássio (40 mM, pH 7,4), contendo succinato de sódio (16 mM), foi pré-incubado com 40-80 mg de proteínas do homogeneizado, a 30°C, durante 30 minutos. Em seguida, foram adicionados 4 mM de azida sódica e 7 mM de rotenona e a reação se iniciou pela adição de 0,6 mg/mL de citocromo c. As absorvâncias foram registradas durante 5 minutos, a 550 nm.

A atividade do complexo IV (citocromo c oxidase) foi determinada de acordo com Rustin e colaboradores (1994) onde o meio de incubação foi composto por tampão fosfato de potássio (10 mM, pH 7,0), dodecil-maltisídeo (0,6 mM) e 10-20 mg de proteínas (homogeneizado). A reação foi iniciada com a adição de 0,7 mg de citocromo c reduzido. A atividade do complexo IV foi medida a 25°C, durante dez minutos. A atividade da citocromo c oxidase foi medida pelo decréscimo na absorvância devido à oxidação de citocromo c previamente reduzido. As leituras foram feitas em 550 nm.

3.3.2 Atividade da Creatina Quinase (CK)

A atividade da CK foi determinada em homogeneizado de tecido (1:10, p/v) em solução salina. Este foi centrifugado a 800 giros, durante 10 minutos e o sobrenadante foi armazenado na temperatura de -80°C para determinação da atividade enzimática. O meio de incubação para dosagem da creatina quinase foi composto por fosfocreatina, ADP e glutatona reduzida. A formação de creatina foi medida por um método colorimétrico de acordo com Hughes et al. (1962). As frações citosólica e mitocondrial da creatina quinase foram separadas por centrifugação (Ramirez e Jimenez, 2000).

3.4 DOSAGEM DE PROTEÍNAS

As proteínas totais foram determinadas pelo método de Lowry e colaboradores (1951) e a albumina bovina sérica (BSA) foi utilizada como padrão.

3.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas através da análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguido pelo teste de Tukey quando p foi significativo. O programa utilizado para a realização das análises foi o software Estatística 7.0. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M). Todos os gráficos foram elaborados no programa Grahpad Prism. A significância estatística foi considerada para valores de $p < 0,05$.

4.RESULTADOS

No complexo I, o ácido fólico (10mg/kg) associado à cetamina reduziu a atividade deste complexo em relação ao grupo controle no córtex frontal ($p=0,016$), hipocampo ($p=0,008$) e estriado ($p=0,002$). Além disso, o ácido fólico (10mg/kg) per se diminuiu a atividade do complexo I no hipocampo ($p=0,003$) e no estriado ($p=0,001$), quando comparado ao grupo controle. Por fim, o ácido fólico (50mg/kg) associado à cetamina ($p=0,001$) aumentou a atividade do complexo I em relação ao grupo controle no estriado (Figura 4).

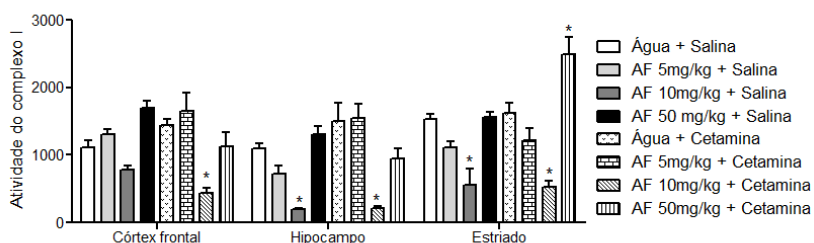


Figura 4: Atividade do complexo I no córtex frontal, hipocampo e estriado de ratos *Wistar* suplementados com ácido fólico (5, 10 ou 50mg/kg) e submetidos ao modelo animal de esquizofrenia induzido por cetamina (25mg/kg). Valores expressos como média±erro padrão média (n=5-7 por grupo). *Diferente do grupo controle. Valores de p significativos quando $p<0,05$.

A administração de cetamina não alterou a atividade do complexo II em nenhuma das estruturas cerebrais analisadas. No entanto, o ácido fólico (5mg/kg) em associação com a cetamina elevou a atividade deste complexo apenas no córtex frontal ($p=0,02$) (Figura 5).

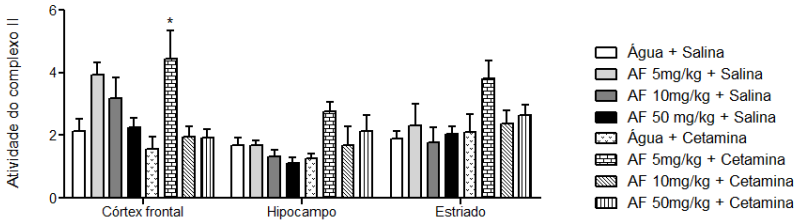


Figura 5: Atividade do complexo II no córtex frontal, hipocampo e estriado de ratos *Wistar* suplementados com ácido fólico (5, 10 ou 50mg/kg) e submetidos ao modelo animal de esquizofrenia induzido por cetamina (25mg/kg). Valores expressos como média±erro padrão média (n=5-7 por grupo). *Diferente do grupo controle. Valores de p significativos quando $p < 0,05$.

A presente pesquisa mostrou que a cetamina não alterou a atividade do complexo II-III no córtex frontal, hipocampo e estriado. Entretanto, no hipocampo ($p=0,004$) houve um aumento da atividade deste complexo pelo ácido fólico (5mg/kg) associado à cetamina em relação ao grupo controle (Figura 6).

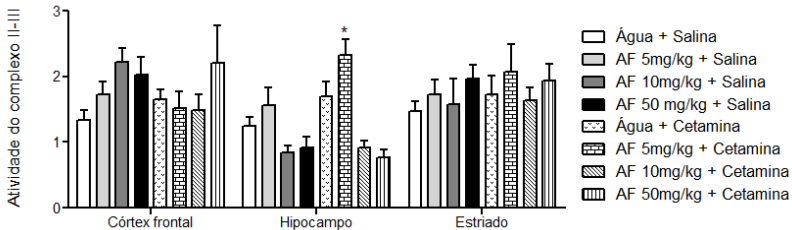


Figura 6: Atividade do complexo II-III no córtex frontal, hipocampo e estriado de ratos *Wistar* suplementados com ácido fólico (5, 10 ou 50mg/kg) e submetidos ao modelo animal de esquizofrenia induzido por cetamina (25mg/kg). Valores expressos como média±erro padrão média (n=5-7 por grupo). *Diferente do grupo controle. Valores de p significativos quando $p < 0,05$.

Em relação ao complexo IV observou-se, apenas no estriado ($p=0,02$), um efeito do ácido fólico (5mg/kg) por se aumentando a atividade deste complexo comparado ao grupo controle (Figura 7).

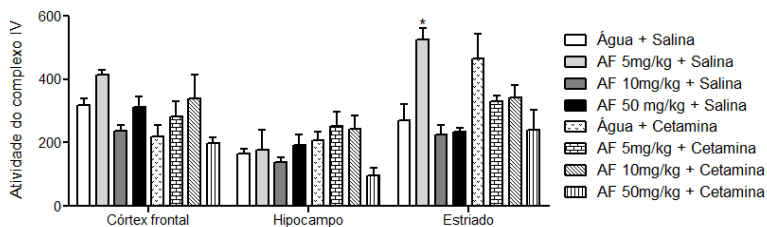


Figura 7: Atividade do complexo IV no córtex frontal, hipocampo e estriado de ratos *Wistar* suplementados com ácido fólico (5, 10 ou 50mg/kg) e submetidos ao modelo animal de esquizofrenia induzido por cetamina (25mg/kg). Valores expressos como média±erro padrão média (n=5-7 por grupo). *Diferente do grupo controle. Valores de p significativos quando $p < 0,05$.

Os achados desta pesquisa demonstram, no córtex frontal, hipocampo e estriado, que a cetamina não alterou atividade da CK. No entanto, houve um aumento significativo da atividade desta enzima pela administração de ácido fólico (10mg/kg) ($p=0,0006$) e (50mg/kg) ($p=0,0002$) per se no córtex pré-frontal (Figura 8).

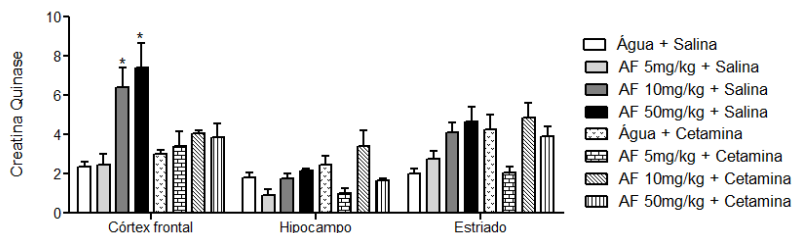


Figura 8: Atividade da creatina quinase no córtex frontal, hipocampo e estriado de ratos *Wistar* suplementados com ácido fólico (5, 10 ou 50mg/kg) e submetidos ao modelo animal de esquizofrenia induzido por cetamina (25mg/kg). Valores expressos como média±erro padrão da média (n=5-7 por grupo). *Diferente do grupo controle. Valores de p significativos quando $p < 0,05$.

5 DISCUSSÃO

Neste estudo foi avaliado o efeito da administração de ácido fólico (5, 10 ou 50mg/kg) no modelo animal de esquizofrenia induzido por cetamina (25mg/kg) quanto à atividade dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial e da enzima CK no SNC de ratos Wistar. Pesquisas sugerem que a cetamina, enquanto modelo de esquizofrenia, é capaz de causar alterações na atividade destes complexos, bem como na atividade da CK (Becker e Grecksch, 2004; Budni et al., 2013). Nossos achados, de modo geral, indicaram resultados contraditórios, uma vez que a administração repetida de cetamina não foi capaz de alterar os parâmetros analisados neste estudo. Verificou-se ainda a hipótese de que o ácido fólico é capaz de mediar o metabolismo energético por sua ação no receptor NMDA no SNC de animais submetidos ao modelo de esquizofrenia (Brocardo et al., 2008, 2009; Budni et al., 2013).

Ensaio clínico apontam resultados promissores associando o ácido fólico ao tratamento medicamentoso padrão tanto na depressão unipolar (Almeida et al., 2015) como na esquizofrenia, especialmente melhorando os sintomas negativos deste transtorno (Roffman et al., 2013). Neste contexto, a pesquisa pré-clínica tem o papel de esclarecer os mecanismos do efeito neuroprotetor do ácido fólico. Dentre os possíveis mecanismos do efeito antidepressivo desta vitamina, estão a diminuição dos níveis de homocisteína (Yang et al., 2010; Koike et al., 2014), bem como o seu efeito antioxidante e ação sobre o receptor NMDA (Budni et al., 2013). Além disso, esta vitamina influencia a produção de NADPH (Fan et al., 2014), exercendo ação protetora através de múltiplos fatores como sua ação antioxidante, estabilização da integridade da membrana mitocondrial e modulação da sinalização de vias relacionadas à oxidação e apoptose (Ding et al., 2011).

No presente estudo, verificou-se no complexo I, que o ácido fólico (10mg/kg) associado à cetamina reduziu a atividade deste complexo em relação ao grupo controle no córtex frontal, hipocampo e estriado. Além disso, o ácido fólico (10mg/kg) per se diminuiu a atividade do complexo I quando comparado ao grupo controle no hipocampo e estriado, enquanto o ácido fólico (50mg/kg) associado à cetamina aumentou a atividade deste complexo em relação ao grupo controle no estriado. Em contrapartida, Akarsu et al. (2014) sugerem níveis elevados, em sangue periférico, de RNAm de proteínas do complexo I em pacientes esquizofrênicos. Além disso, no modelo animal de esquizofrenia, nossos resultados são corroborados pelo estudo de Zugno et al. (2015) cujos achados também não demonstraram

alteração do complexo I quando administrada cetamina aguda em ratos Wistar.

Em relação ao complexo II desperta a atenção o fato de que o ácido fólico (5mg/kg) em associação com a cetamina tenha aumentado a atividade deste complexo no córtex frontal. De acordo com Bubber et al. (2011) o aumento da atividade do complexo II, junto com a Succinato Desidrogenase, pode ser um efeito compensatório contra um déficit na produção de ATP pelos neurônios no córtex frontal. Os resultados obtidos pela suplementação de ácido fólico (5mg/kg) associado à cetamina no complexo II podem ser, ao menos em parte, comparado ao trabalho de Prince et al. (1999), o qual detectou aumento do complexo II em regiões cerebrais (putâmen e núcleo accumbens) post mortem de pacientes esquizofrênicos. Resultados em humanos, em geral, foram obtidos de pacientes post mortem em sua maioria cronicamente medicados. É possível, portanto, que achados encontrados neste e em outros estudos sejam devido a alterações compensatórias (do ácido fólico e dos antipsicóticos) sobre a disfunção energética na esquizofrenia (Bubber et al., 2011). Pesquisa pré-clínica ainda sugere que o complexo II está relacionado à sinalização do receptor NMDA e à ação da dopamina, especialmente, no estriado (Calabresi et al., 2001). Estudos utilizando antipsicóticos em modelos animais demonstraram inibição do complexo II pela clozapina e haloperidol (Streck et al., 2007; Barrientos et al., 1998). Estes resultados pré-clínicos sugerem que a ação neuroprotetora do ácido fólico, se ocorrer, pode ser por mecanismos diferentes dos antipsicóticos, uma vez que esta vitamina apresenta importante ação antioxidante, sendo fundamental para o metabolismo de 1C e formação de neurotransmissores (Brocardo et al., 2010; Budni et al., 2013).

O complexo III é um conjunto de proteínas cuja deficiência está envolvida em algumas síndromes raras, como a encefalopatia, causada por mutações ainda pouco investigadas (Fernández-Vizorra e Zeviani, 2015; Ghezzi et al., 2011). Assim, a presente pesquisa mostrou que no hipocampo houve um aumento da atividade do complexo II-III no grupo ácido fólico (5mg/kg) associado à cetamina em relação ao grupo controle. Existem ainda poucas pesquisas sobre o papel do complexo III na esquizofrenia. No entanto, estudo recente não encontrou diferença significativa entre os níveis de RNAm do complexo III quando comparado indivíduos esquizofrênicos e controles (Akarsu et al., 2014).

O complexo IV é uma enzima cuja atividade mostra-se alterada no SNC de pacientes esquizofrênicos (Cavelier et al., 1995). No estriado, observou-se apenas um efeito do ácido fólico (5mg/kg) por se

umentando a atividade do complexo IV em relação ao grupo controle. Estudos clínicos sobre as alterações do complexo IV têm sugerido resultados controversos. Cavalier et al. (1995) e Prince et al. (1999), além de Maurer et al. (2001), demonstraram diminuição do complexo IV em núcleo caudado de esquizofrênicos post mortem e diminuição da atividade do complexo IV no córtex pré-frontal, respectivamente.

É sabido que o estriado é uma estrutura cerebral intrinsecamente relacionada à fisiopatologia da esquizofrenia sendo alvo dos circuitos dopaminérgicos que estão alterados neste transtorno (Kuswanto et al., 2015). De forma paradoxal, um estudo post mortem (Prince et al., 2000) encontrou correlação estatística entre o aumento da atividade do complexo IV no putâmen (estrutura que faz parte do estriado) e a melhora no desempenho cognitivo, retrospectivamente, em pacientes crônicos e medicados, sugerindo então, que em humanos, isso possa ser devido ao efeito dos antipsicóticos. No presente estudo foi observado um aumento da atividade do complexo IV no estriado, pela ação do ácido fólico (5mg/kg) per se, o qual pode resultar da interação com o receptor NMDA e de diversas ações protetoras sobre a mitocôndria (Chen et al., 2013). Por outro lado, este trabalho apresenta limitações metodológicas, impedindo que se faça uma correlação fidedigna entre os achados no modelo animal e os achados em seres humanos. Uma das mais importantes limitações é que em pacientes post mortem pode-se dissecar as estruturas cerebrais que compõe o estriado, enquanto nos roedores, as análises moleculares são realizadas na estrutura por inteiro.

O estudo das alterações mitocondriais na esquizofrenia iniciou-se com a constatação de sintomas psiquiátricos em pacientes com doenças raras da função mitocondrial (Ben-Shachar e Laifenfeld, 2004; Anglin et al., 2012). Sendo os neurônios altamente dependentes do ATP produzido pela cadeia respiratória mitocondrial, é plausível supor a que a perda da sua eficiência comprometa os sistemas de neurotransmissão (Yadava et al., 2007). Na esquizofrenia, a hipótese mais estudada atualmente é da hipofunção neuronal, em especial no córtex pré-frontal, causando uma incapacidade de regular os estímulos internos e externos e predispondo à psicose e ao déficit cognitivo (Yang et al., 2013). Por um lado, tem-se a diminuição da glicólise aeróbia, em consequência da hipofunção das mitocôndrias, evidenciada pelo aumento do pH em estudos de imagem funcional in vivo (Du et al., 2014). Por outro, uma diminuição em geral do Ciclo de Krebs, com queda da atividade das enzimas da primeira metade do ciclo seguido pelo aumento compensatório da atividade das enzimas da segunda metade do ciclo (Bubber et al., 2011). Além disso, tanto a atividade quanto a produção

da enzima CK estão diminuídos no SNC de pacientes esquizofrênicos post mortem (Burbaeva et al., 2008), bem como num estudo de imagem funcional (in vivo) de pacientes esquizofrênicos (Du et al., 2014). Dessa forma, pensa-se que uma abordagem terapêutica e preventiva na esquizofrenia poderia incluir a suplementação de nutrientes capazes de reparar ou prevenir significativamente o dano ao metabolismo energético nesses pacientes (Zugno et al., 2014).

A enzima CK está envolvida na estocagem de fosfatos de alta energia produzidos pela mitocôndria, ou seja, catalisa a transferência reversível do grupo N-fosforil da fosfocreatina para ADP, regenerando o ATP (Pilla et al., 2003). Há indícios de que a atividade desta enzima esteja alterada em diversas patologias (Pilla et al., 2003; Funchal et al., 2006). Estudos de Burbaeva et al. (1987, 1999, 2008), mostraram uma diminuição desta enzima em tecido cerebral post mortem de pacientes esquizofrênicos, sugerindo que essa redução pode estar associada à disfunção energética cerebral presente na esquizofrenia. Outra questão a ser considerada nos estudos de Burbaeva é que o uso de neurolépticos pelos pacientes pode ter influenciado nos resultados.

Achados da presente pesquisa demonstraram que a cetamina não alterou a atividade da enzima CK no córtex frontal, hipocampo e estriado. No entanto, houve um aumento significativo da atividade da CK pela administração de ácido fólico (10mg/kg e 50mg/kg) per se no córtex frontal. Um mecanismo capaz de explicar, ao menos em parte, este achado relaciona-se ao aumento da disponibilidade de grupos metil proporcionado pelo ácido fólico, sendo esta disponibilidade fundamental para a síntese endógena da creatina (Allen, 2012).

Resumidamente, as alterações nas quais o ácido fólico per se e/ou associado à cetamina foi capaz de alterar a atividade dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial e/ou da enzima CK podem ser explicadas por uma provável ação inibitória do receptor NMDA (a mesma via da cetamina) pelo ácido fólico, dependendo da dose administrada (Brocardo et al., 2008; Chen et al., 2013). Uma observação importante é que os efeitos do ácido fólico não variaram de forma proporcional conforme a dose. Os efeitos não previsíveis das doses desta vitamina podem ser explicados pela sensibilidade da mitocôndria à complexa sinalização de cálcio, a qual pode ser influenciada tanto pela cetamina quanto pelo ácido fólico (Tijattas et al., 2004).

O presente trabalho apresenta uma importante limitação quanto ao modelo animal de cetamina. Este anestésico é capaz de induzir efeitos psicotomiméticos sendo este um efeito colateral. Ainda, em baixas doses, a cetamina pode ser utilizada como droga de abuso,

levando a efeitos euforizantes (Malhotra et al., 1997; Becker e Grecksch, 2004; Zugno et al., 2014). Sendo a cetamina um antagonista do receptor NMDA, sua ação pode variar amplamente conforme a dose e o tempo de uso (Zugno et al., 2013; 2015). Sabe-se que a cetamina aguda em baixas doses tem sido testada em estudos clínicos como terapia adjuvante na depressão grave (Assis et al., 2009; Garcia et al., 2009). Assim, no presente estudo, a ação do ácido fólico aumentando a atividade da CK, assemelha-se à cetamina (15mg/kg) e ao antidepressivo imipramina conforme estudos anteriores do mesmo laboratório (Assis et al., 2009).

Por fim, estabeleceu-se neste laboratório de pesquisa, que em ratos Wistar, a cetamina administrada na dose (15mg/kg) apresenta efeito antidepressivo e na dose (25mg/kg) repetidamente induz efeitos psicotomiméticos e indutores de alterações semelhantes aos sintomas da esquizofrenia em humanos (Zugno et al., 2014). Sendo a esquizofrenia um transtorno multifatorial, novos estudos utilizando a cetamina combinada a outros modelos tornam-se necessários a fim de produzir em animais alterações semelhantes ao transtorno em humanos (Brown, 2011; Ibi et al., 2010; Zugno et al., 2013).

Concluindo, é sabido o papel que o ácido fólico desempenha na fisiopatologia da esquizofrenia, porém o exato mecanismo pelo qual esta relação ocorre permanece desconhecido. Além disso, sabe-se que o uso crônico de ácido fólico em altas doses pode causar efeitos colaterais, inclusive, constituir um fator de risco para alguns tipos de câncer (Rodriguez et al., 2015; Keating et al., 2015). De qualquer forma, ainda não se conhece a extensão dos potenciais efeitos danosos no SNC de seres humanos submetidos a altas doses de ácido fólico por tempo prolongado (Asadi-Pooya, 2015).

6 CONCLUSÃO

Achados deste estudo demonstram que a administração repetida de cetamina não foi capaz de alterar a atividade dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial e da enzima CK no SNC de ratos Wistar. De modo geral, o ácido fólico per se e/ou associado à cetamina foi capaz de alterar a atividade dos complexos I, II, II-III e IV da cadeia respiratória e/ou da enzima CK nas estruturas cerebrais avaliadas. Conclui-se, portanto, que ambos os tratamentos aplicados individualmente, ou combinados não apresentam efeitos claros positivos ou negativos associados ao modelo animal de esquizofrenia induzido por cetamina. A atividade dos complexos da cadeia respiratória das estruturas cerebrais investigadas é afetada pelas intervenções, contudo, não apresentam efeito padrão e conclusivo. Novos estudos clínicos e pré-clínicos se fazem necessários, a fim de desvendar os reais mecanismos do efeito neuroprotetor do ácido fólico na esquizofrenia, bem como buscar protocolos mais fidedignos quanto ao tempo de administração e as melhores doses a serem administradas neste transtorno.

REFERÊNCIAS

Açkurt F, Wetherilt H, Löker M, Hacibekirog M. Biochemical assessment of nutritional status in pre- and post-natal Turkish women and outcome of pregnancy. *Eur J Clin Nutr.* 1995; 49: 613-22.

Allen PJ. Creatine metabolism and psychiatric disorders: Does creatine supplementation have therapeutic value? *Neurosci Biobehav Rev.* 2012; 36(5): 1442–62.

Almeida OP, Ford AH, Flicker L. Systematic review and meta-analysis of randomized placebo-controlled trials of folate and vitamin B12 for depression. *Int Psychogeriatr.* 2015; 27(5): 727-37.

Akarsu S, Torun D, Bolu A, Erdem M, Kozan S, Ak M, Akar H, Uzun Ö. Mitochondrial complex I and III gene mRNA levels in schizophrenia, and their relationship with clinical features. *J Mol Psychiatry.* 2014; 2(1): 6.

Akabarian S, Kim JJ; Potkin SG; Hagman JO, Tafazzoli A, Bunney We JR, Jones EG. Gene expression for glutamic acid decarboxylase is reduced without loss of neurons in prefrontal cortex of schizophrenics. *Arch Gen Psychiatry.* 1995; 52: 258-78.

Aksenova MV, Burbaeva GSh. BB creatine kinase isoenzyme activity in the blood serum of patients with senile dementia, Alzheimer's disease and schizophrenia. *Zh Nevropatol Psikhiatr Im S S Korsakova.* 1989; 89(9): 113-6.

Aksenova MV, Karaseva NS, Burbaeva GSh. Creatine phosphokinase isoenzymes (CK BB) of the brain in peripheral tissues in schizophrenia. *Zh Nevropatol Psikhiatr Im S S Korsakova.* 1991; 91(10): 36-8.

Aksenova MV, Aksenov Michael Y, Markesbery WR, Butterfield, DA. Aging in a dish: Age:dependent changes of neuronal survival, protein oxidation, and creatine kinase BB expression in long-term hippocampal cell culture. *J Neurosci Res.* 1999; 58: 308-17.

Anand A, Charney DS, Oren DA, Berman RM, Hu XS, Cappiello A, Krystal JH. Attenuation of the neuropsychiatric effects of ketamine with lamotrigine: support for hyperglutamatergic effects of N-methyl-D-aspartate receptor antagonists. *Arch Gen Psychiatry*. 2000; 57(3): 270-6.

Anglin RE, Garside SL, Tarnopolsky MA, Mazurek MF, Rosebush PI. The psychiatric manifestations of mitochondrial disorders: a case and review of the literature. *J Clin Psychiatry*. 2012; 73(4): 506-12.

Asadi-Pooya AA. High dose folic acid supplementation in women with epilepsy: Are we sure it is safe? *Seizure*. 2015; 27: 51-3.

Assis LC, Scaini G, Di-Pietro PB, Castro AA, Comim CM, Streck EL, Quevedo J. Effect of antipsychotics on creatine kinase activity in rat brain. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2007; 101(5): 315-9.

Assis LC, Rezin GT, Comim CM, Valvassori SS, Jeremias IC, Zugno AI, Quevedo J, Streck EL. Effect of acute administration of ketamine and imipramine on creatine kinase activity in the brain of rats. *Rev Bras Psiquiatr*. 2009; 31(3): 247-52.

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

Bakker CB, Amini FB. Observations on the psychotomimetic effects of Sernyl. *Compr Psychiatry*. 1961; 2: 269-80.

Barrientos A, Marín C, Miró O, Casademont J, Gómez M, Nunes V, Tolosa E, Urbano-Márquez A, Cardellach F. Biochemical and molecular effects of chronic haloperidol administration on brain and muscle mitochondria of rats. *J Neurosci Res*. 1998; 53(4): 475-81.

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): 1267-7.

Ben-Shachar D, Zuk R, Gazawi H, Reshef A, Sheinkman A, Klein E. Increased mitochondrial complex I activity in platelets of schizophrenic patients. *Int J Neuropsychopharmacol*. 1999; 2: 245–53.

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

Ben-Shachar D, Bonne O, Chisin R; Klein E, Lester H; Aharon-Peretz J, Yona I, Freedman N. Cerebral glucose utilization and platelet mitochondrial complex I activity in schizophrenia. *Prog. Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2007; 31: 807-13.

Ben-Shachar D, Nadri C, Karry R, Agam G. Mitochondrial complex I subunits are altered in rats with neonatal ventral hippocampal damage but not in rats exposed to oxygen restriction at neonatal age. *J Mol Neurosci*. 2009; 38(2): 143-51.

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

Boldyrev AA, Bryushkova EA, Vladychenskaya EA. NMDA receptors in immune competent cells. *Biochemistry (Mosc)*. 2012; 77(2): 128-34.

Boison D, Singer P, Shen HY, Feldon J, Yee BK. Adenosine hypothesis of schizophrenia - Opportunities for pharmacotherapy. *Neuropharmacology* in press. 2011.

Boulay D, Bergis O, Avenet P, Griebel G. The glycine transporter-1 inhibitor SSR103800 displays a selective and specific antipsychotic-like profile in normal and transgenic mice. *Neuropsychopharmacology*. 2010; 35(2): 416-27.

Brocardo PS, Budni J, Lobato KR, Kaster MP, Rodrigues AL. Antidepressant-like effect of folic acid: Involvement of NMDA receptors and L-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway. *Eur J Pharmacol*. 2008; 598(1-3): 37-42.

Brocardo PS, Budni J, Lobato KR, Santos AR, Rodrigues AL. Evidence for the involvement of the opioid system in the antidepressant-

like effect of folic acid in the mouse forced swimming test. *Behav Brain Res.* 2009; 200(1): 122-7.

Brooks JM, Sarter M, Bruno JP. Transient Inactivation of the Neonatal Ventral Hippocampus Permanently Disrupts the Mesolimbic Regulation of Prefrontal Cholinergic Transmission: Implications for Schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* in press. 2011.

Brown AS, Susser ES, Butler PD, Andrews RR, Kaufmann CA, Gorman JM. Neurobiological plausibility of prenatal nutritional deprivation as a risk factor for schizophrenia. *J Nerv Ment Dis.* 1996; 184: 71- 85.

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

Bruinse HW, Van Den Berg H. Changes of some vitamin levels during and after normal pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1995; 61: 31-7.

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

Bubeníková-Valesová V, Horáček J, Vrajová M, Höschl C. Models of schizophrenia in humans and animals based on inhibition of NMDA receptors. *Neurosci Biobehav Rev.* 2008; 32(5): 1014-23.

Budni J, Romero A, Molz S, Martín-de-Saavedra MD, Egea J, Barrio L, Tasca CI; Rodrigues AL; López MG. Neurotoxicity induced by dexamethasone in the human neuroblastoma SH-SY5Y cell line can be prevented by folic acid. *Neuroscience.* 2011; 190: 346-53.

Budni J, Zomkowski AD, Engel D, Santos DB, dos Santos AA, Moretti M, Valvassori SS, Ornell F, Quevedo J, Farina M, Rodrigues AL Folic acid prevents depressive-like behavior and hippocampal antioxidant imbalance induced by restraint stress in mice. *Exp Neurol.* 2013; 240: 112-21.

Burbaeva GSh, Aksenova MV, Bibikova VI. BB creatine phosphokinase activity of the brain structures of mentally healthy

persons and schizophrenics. *Zh Nevropatol Psikhiatr Im S S Korsakova*. 1987; 87(7): 1024-8.

Burbaeva GSh, Savushkina OK, Dmitriev AD. [Brain isoforms of creatine kinase in health and mental diseases: Alzheimer's disease and schizophrenia]. *Vestn Ross Akad Med Nauk*. 1999; (1): 20-4.

Burbaeva Gsh, Savushkina OK, Boksha IS. Creatine kinase BB in brain in schizophrenia. *World Biology Psychiatric*. 2003; 4: 177-83.

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

Callicot JH, Egan MF, Mattay VS, Bertolino A, Bone AD, Verchinski B, Weinberger DR. Abnormal fMRI response of the dorsolateral prefrontal cortex in cognitively intact siblings of patients with schizophrenia. *Am J Psychiatry*. 2003; 160(4): 709-19.

Calabresi P, Gubellini P, Picconi B, Centonze D, Pisani A, Bonsi P, Greengard P, Hipskind RA, Borrelli E, Bernardi G. Inhibition of mitochondrial complex II induces a long-term potentiation of NMDA-mediated synaptic excitation in the striatum requiring endogenous dopamine. *J Neurosci*. 2001; 21(14): 5110-20.

Canever L, Oliveira L, D'Altoé De Luca R, Correa PT, De B Fraga D, Matos MP, Scaini G, Quevedo J, Streck EL, Zugno AI. A rodent model of schizophrenia reveals increase in creatine kinase activity with associated behavior changes. *Oxid Med Cell Longev*. 2010; 3(6): 421-7.

Carlsson M, Svensson A. Interfering with glutamatergic neurotransmission by means of NMDA antagonist administration discloses the locomotor stimulatory potential of other transmitter systems. *Pharmacol Biochem Behav*. 1990; 36: 45-50.

Cavelier L, Jazin E, Eriksson I, Prince J, Bave U, Orelund L, Gyllensten U. Decreased cytochrome c oxidase activity and lack of age

related accumulation of mtDNA in brain of schizophrenics. *Genomics*. 1995; 29: 217-28.

Carney MW, Chary TK, Laundry M, Bottiglieri T, Chanarin I, Reynolds EH, Toone B. Red cell folate concentrations in psychiatric patients. *J Affect Disord*. 1990; 19: 207-13.

Cassina, Radi R. Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. *Arch Biochem Biophys*. 1996. 328: 309-16.

Chen TF, Tang MC, Chou CH, Chiu MJ, Huang RF. Dose-dependent folic acid and memantine treatments promote synergistic or additive protection against A β (25-35) peptide-induced apoptosis in SH-SY5Y cells mediated by mitochondria stress-associated death signals. *Food Chem Toxicol*. 2013; 62: 538-47.

Clark D, Dedova I, Cordwell S; Matsumoto I. A proteome analysis of the anterior cingulate cortex gray matter in schizophrenia. *Mol Psychiatry*. 2006; 11: 459-70.

Clay HB, Sullivan S, Konradi C. Mitochondrial dysfunction and pathology in bipolar disorder and schizophrenia. *Int J DevNeurosci*. 2009; 29(3): 311-24.

Coppen A, Bolander-Gouaille C. Treatment of depression: time to consider folic acid and vitamin B12. *J Psychopharmacol*. 2005; 19(1): 59-65.

Davies J, Evans RH, Francis AA, Watkins JC. Excitatory amino acid receptors and synaptic excitation in the mammalian central nervous system. *J Physiol (Paris)*. 1979; 75(6): 641-54.

Davey GP, Peuchen S, Clark JB. Energy thresholds in brain mitochondria: potential involvement in neurodegeneration. *J Biol Chem*. 1998; 273: 12753-7.

Deakin JF, Slater P, SI MD, Gilchrist AC, Skan WJ, Royston MC, Reynolds GP, Gross AJ. Frontal cortical and left temporal glutamatergic dysfunction in schizophrenia. *Journal of Neurochemistry*. 1989; 52: 1781-6.

Deakin JF, Simpson MD. A two-process theory of schizophrenia: evidence from studies in post-mortem brain. *J Psychiatr Res.* 1997; 31(2): 277-95.

De Oliveira L, Spiazzi CM, Bortolin T, Canever 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 Neuro-psychopharmacol Biol Psychiatry.* 2009; 33: 1003-8.

De Oliveira L, Fraga DB, De Luca RD, Canever L, Ghedim FV, Matos MP, Streck EL, Quevedo J, Zugno AI. Behavioral changes and mitochondrial dysfunction in a rat model of schizophrenia induced by ketamine. *Metab Brain Dis.* 2011; 26(1): 69-77.

Deng MY, Lam S, Meyer U, Feldon J, Li Q, Wei R, Luk L, Chua SE, Sham P, Wang Y, McAlonan GM. Frontal-subcortical protein expression following prenatal exposure to maternal inflammation. *PLoS One.* 2011; 6(2): e16638.

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

Ding B, Yuan L, Yu H, Li L, Ma W, Bi Y, Feng J, Xiao R. Genistein and folic acid prevent oxidative injury induced by β -amyloid peptide. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2011; 108(5): 333-40.

Dolder CR, Lacro JP, Dunn LB, Jeste DV. Antipsychotic medication adherence: is there a difference between typical and atypical agents? *Am J Psychiatry.* 2002; 159(1): 103-8.

Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods in Enzymology.* 1990; 186: 421-31.

Dror N, Klein E, Karry R, Sheinkman A, Kirsh Z, Mazor M, Tzukerman M, Ben-Shachar D. State dependent alterations in mitochondrial complex I activity in platelets: A potential peripheral marker for schizophrenia. *Mol Psychiatry.* 2002; 7: 995-1001.

Du F, Cooper AJ, Thida T, Sehovic S, Lukas SE, Cohen BM, Zhang X, Ongür D. In vivo evidence for cerebral bioenergetic

abnormalities in schizophrenia measured using 31P magnetization transfer spectroscopy. *JAMA Psychiatry*. 2014; 71(1): 19-27.

Dursun SM, Deakin JFW. Augmenting antipsychotic treatment with lamotrigine or topiramate in patients with treatment-resistant schizophrenia: a naturalistic case-series outcome study. *J Psychopharmacol*. 2001; 15: 297-301.

Elsworth JD, Groman SM, Jentsch JD, Valles R, Shahid M, Wong E, Marston H, Roth RH. Asenapine effects on cognitive and monoamine dysfunction elicited by subchronic phencyclidine administration. *Neuropharmacology* in press. 2011.

Fan J, Ye J, Kamphorst JJ, Shlomi T, Thompson CB, Rabinowitz JD. Quantitative flux analysis reveals folate-dependent NADPH production. *Nature*. 2014; 510(7504): 298-302.

Fernández-Vizarra E, Zeviani M. Nuclear gene mutations as the cause of mitochondrial complex III deficiency. *Front Genet*. 2015; 6:134.

Fischer JC, Ruitenbeek W, Berden JA, Trijbels JM, Veerkamp JH, Stadhouders MS, Sengers RC, Jansen AJ. Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. *Clinical Chimica Acta*. 1985; 153: 23-6.

Fraga DB, Deroza PF, Ghedim FV, Steckert AV, De Luca RD, Silverio A, Cipriano AL, Leffa DD, Borges GD, Quevedo J, Pinho RA, Andrade VM, Pizzol FD, Zugno AI. Prenatal exposure to cigarette smoke causes persistent changes in the oxidative balance and in DNA structural integrity in rats submitted to the animal model of schizophrenia. *J Psychiatr Res* in press. 2011.

Funchal C, Schuck PF, Santos AQ, Jacques-Silva MC, Gottfried C, Pessoa-Pureur R, Wajner M. Creatine and antioxidant treatment prevent the inhibition of creatine kinase activity and the morphological alterations of C6 glioma cells induced by the branched-chain alpha-keto acids accumulating in maple syrup urine disease. *Cell Mol Neurobiol*. 2006; 26(1): 67-79.

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

García-Miss M Del R, Pérez-Mutul J, López-Canul B, Solís-Rodríguez F, Puga-Machado L, Oxté-Cabrera A, Gurubel-Maldonado J, Aranowsky-Sandoval G. Folate, homocysteine, interleukin-6, and tumor necrosis factor alfa levels, but not the methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism, are risk factors for schizophrenia. *J Psychiatr Res*. 2010; 44(7): 441-6.

Ghezzi D, Arzuffi P, Zordan M, Da Re C, Lamperti C, Benna C, D'Adamo P, Diodato D, Costa R, Mariotti C, Uziel G, Smiderle C, Zeviani M. Mutations in TTC19 cause mitochondrial complex III deficiency and neurological impairment in humans and flies. *Nat Genet*. 2011; 43(3): 259-63.

Geyer MA, Ellenbroek B. Animal behavior models of the mechanisms underlying antipsychotic atypicality. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2003; 27: 1071-9.

Gilmer TP, Dolder CR, Lacro JP, Folsom DP, Lindamer L, Garcia P, Jeste DV. Adherence to treatment with antipsychotic medication and health care costs among Medicaid beneficiaries with schizophrenia. *Am J Psychiatry*. 2004; 161(4): 692-9.

Godfrey PS, Toone BK, Carney MW, Flynn TG, Bottiglieri T, Laundry M, Chanarin I, Reynolds EH. Enhancement of recovery from psychiatric illness by methylfolate. *Lancet*. 1990; 336(8712): 392-5.

Goff DC, Bottiglieri T, Arning E, Shih V, Freudenreich O, Evins AE, Henderson DC, Baer L, Coyle J. Folate, homocysteine, and negative symptoms in schizophrenia. *Am J Psychiatry*. 2004; 161: 1705-8.

Graeff FG, Brandão ML. *Neurobiologia das Doenças Mentais*. 5.ed. São Paulo: Lemos, 1999, p.96

Haidemenos A, Kontis D, Gazi A, Kallai E, Allin M, Lucia B. Plasma homocysteine, folate and B12 in chronic schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2007; 31(6): 1289-96.

Hashimoto K, Fujita Y, Iyo M. Phencyclidine-induced cognitive deficits in mice are improved by subsequent subchronic administration of fluvoxamine: role of sigma-1 receptors. *Neuropsychopharmacology*. 2007; 32: 514-21.

Harrison PJ, Weinberger DR. Schizophrenia genes, gene expression, and neuropathology: on the matter of their convergence. *Mol Psychiatry*. 2005; 10: 40-68.

Herrán A, García-Unzueta MT, Amado JÁ, López-Cordovilla JJ, Díez-Manrique JF, Vázquez-Barquero JL. Folate levels in psychiatric out patients. *Psychiatry ClinNeurosci*. 1999; 53: 531-3.

Ho A, Michelson D, Aaen G, Ashwal S. Cerebral folate deficiency presenting as adolescent catatonic schizophrenia: a case report. *J Child Neurol*. 2010; 25(7): 898-900.

Hoek HW, Brown AS, Susser E. The Dutch famine and schizophrenia spectrum disorders. *Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol*. 1998; 33: 373-9.

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

Ibi D, Nagai T, Koike H, Kitahara Y, Mizoguchi H, Niwa M, Jaaro-Peled H, Nitta A, Yoneda Y, Nabeshima T, Sawa A, Yamada K. Combined effect of neonatal immune activation and mutant DISC1 on phenotypic changes in adulthood. *Behav Brain Res*. 2010; 206(1): 32-7

Iskandar BJ, Nelson A, Resnick D, Pate Skene JH, Gao P, Johnson C, Cook TD, Hariharan N. Folic acid supplementation enhances repair of the adult central nervous system. *Ann Neurol*. 2004; 56: 221-7.

Javitt DC, Zukin SR. Recent advances in the phencyclidine model of schizophrenia. *Am J Psychiatry*. 1991; 148(10): 1301-8.

Javitt DC, Shelley AM, Silipo G, Lieberman JA. Deficits in auditory and visual context-dependent processing in schizophrenia: defining the pattern. *Arch Gen Psychiatry*. 2000; 57: 1131-7.

Javitt DC. Glutamatergic theories of schizophrenia. *Isr J Psychiatry Relat Sci*. 2010; 47(1): 4-16.

Kale A, Naphade N, Sapkale S, Kamaraju M, Pillai A, Joshi S, Mahadik S. Reduced folic acid, vitamin B12 and docosahexaenoic acid and increased homocysteine and cortisol in never-medicated schizophrenia patients: implications for altered one-carbon metabolism. *Psychiatry Res*. 2010; 175(1-2): 47-53.

Kane JM, Correl CU. Pharmacologic treatment of schizophrenia. *Dialogues Clin Neurosci*. 2010; 12(3): 345-57.

Kapur S, MAMO D. Half a century of antipsychotics and still a central role for dopamine D2 receptors. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2003; 27: 1081-90.

Karry R, Klein E, Ben Shachar D. Mitochondrial complex I subunits expression is altered in schizophrenia: a postmortem study. *Biol Psychiatry*. 2004; 55(7): 676-84.

Keshavan MS, Nasrallah HA, Tandon R. Schizophrenia, "Just the Facts" 6. Moving ahead with the schizophrenia concept: From the elephant to the mouse. *Schizophr Res*. 2011; 127: 3-13.

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

Keating E, Correia-Branco A, Araújo JR, Meireles M, Fernandes R, Guardão L, Guimarães JT, Martel F, Calhau C. Excess perigestational folic acid exposure induces metabolic dysfunction in post-natal life. *J Endocrinol*. 2015; 224(3): 245-59.

Koike S, Bundo M, Iwamoto K, Suga M, Kuwabara H, Ohashi Y, Shinoda K, Takano Y, Iwashiro N, Satomura Y, Nagai T, Natsubori T, Tada M, Yamasue H, Kasai K. A snapshot of plasma metabolites in

first-episode schizophrenia: a capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry study. *Transl Psychiatry*. 2014; 4: e379.

Krebs MO, Bellon A, Mainguy G, Jay TM, Frieling H. One-carbon metabolism and schizophrenia: current challenges and future directions. *Trends Mol Med*. 2009; 15(12): 562-70.

Kronenburg G, Colla M, Endres M. Folic acid, neurodegenerative and neuropsychiatric disease. *Curr Mol Med*. 2009; 9(3): 315-23.

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: 199-214.

Kuswanto CN, Sum MY, Qiu A, Sitoh YY, Liu J, Sim K. The impact of genome wide supported microRNA-137 (MIR137) risk variants on frontal and striatal white matter integrity, neurocognitive functioning, and negative symptoms in schizophrenia. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2015.

Lara DR, Dall'Igna OP, Ghisolfi ES, Brunstein MG. Involvement of adenosine in the neurobiology of schizophrenia and its therapeutic implications. *Prog Neuropsychopharmacol Biol*. 2006; 30: 617-29.

Lerner MH, Friedhoff AJ. Radioimmunoassay measurement of creatine kinase BB in the serum of schizophrenic patients. *Clin Chim Acta*. 1980; 107(1-2): 121-8.

Leucht C, Heres S, Kane JM, Kissling W, Davis JM, Leucht S. Oral versus depot antipsychotic drugs for schizophrenia--a critical systematic review and meta-analysis of randomised long-term trials. *Schizophr Res*. 2011; 127(1-3): 83-92.

Levine J, Stahl Z, Sela BA, Ruderman V, Shumaico O, Babushkin I, Osher Y, Bersudsky Y, Belmaker RH. Homocysteine-reducing strategies improve symptoms in chronic schizophrenic patients with hyperhomocysteinemia. *Biol Psychiatry*. 2006; 60: 265-9.

Lipska BK, Weinberger DR. To model a psychiatric disorder in animals: schizophrenia as a reality test. *Neuropsychopharmacology*. 2000; 23(3): 223-39.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951; 193: 265-75.

Luby ED, Cohen BD, Rosenbaum G, Gottlieb JS, Kelley R. Study of a new schizophrenomimetic drug: serenyl. *Arch Neurol Psychiatry*. 1959; 71: 363-9.

Lucock M. Folic acid: beyond metabolism. *JEBCAM*. 2011; 16: 102-13.

Lutkenhoff ES, Van Erp TG, Thomas MA, Thermann S, Manninen M, Huttunen MO, Kaprio J, Lönnqvist J, O'Neill J, Cannon TD. Proton MRS in twin pairs discordant for schizophrenia. *Mol Psychiatry*. 2010; 15: 308-18.

Malhotra AK, Pinals DA, Adler CM, Elman I, Clifton A, Pickar D, Breier A. Ketamine-induced exacerbation of psychotic symptoms and cognitive impairment in neuroleptic-free schizophrenics. *Neuropsychopharmacology*. 1997; 3: 141-50.

Maurer I, Möller HJ. Inhibition of complex I by neuroleptics in normal human brain cortex parallels the extrapyramidal toxicity of neuroleptics. *Mol Cell Biochem*. 1997; 174(1-2): 255-9.

Maurer I, Zierz S, Möller HJ. Evidence for a mitochondrial oxidative phosphorylation defect in brains from patients with schizophrenia. *Schizophr Res*. 2001; 48: 125-36.

Meltzer HY. Serum creatine phosphokinase in schizophrenia. *Am J Psychiatry*. 1976; 133(2): 192-7.

Marek GJ, Behl B, Beshpalov AY, Gross G, Lee Y, Schoemaker H. Glutamatergic (N-methyl-D-aspartate receptor) hypofrontality in schizophrenia: too little juice or a miswired brain? *Mol Pharmacol*. 2010; 77(3): 317-26.

Marsman A, Van Den Heuvel MP, Klomp DW, Kahn RS, Luitjen PR, Hulshof Pol HE. Glutamate in Schizophrenia: A Focused Review and Meta-Analysis of 1H-MRS Studies. *Schizophr Bull* in press. 2011.

Martins-de-Souza D, Gattaz WF, Schmitt A, Rewerts C, Marangoni S, Novello JC, Maccarone G, Turck CW, Anddias-Neto E. Alterations in oligodendrocyte proteins, calcium homeostasis and new potential markers in schizophrenia anterior temporal lobe are revealed by shotgun proteome analysis. *J Neural Transm*. 2009; 116: 275-89.

Martins-de-Souza D, Harris LW, Guest PC, Bahn S. The role of energy metabolism dysfunction and oxidative stress in schizophrenia revealed by proteomics. *Antioxid Redox Signal*. 2011; 15(7): 2067-79.

Maurer I, Moller HJ. Inhibition of complex I by neuroleptics in normal human brain cortex parallels the extrapyramidal toxicity of neuroleptics. *Mol Cell Biochem*. 1997; 174: 255-9.

Mattson MP, Shea TB. Folate and homocysteine metabolism in neural plasticity and neurodegenerative disorders. *Neuroscience*. 2003; 26: 137-46.

Mattson MP, Liu D. Mitochondrial potassium channels and uncoupling proteins in synaptic plasticity and neuronal cell death. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003; 304(3): 539-49.

McGrath JJ, Susser ES. New directions in the epidemiology of schizophrenia. *Med J Aust*. 2009; 190(4): S7-S9.

McGrath J, Brown A. ST, Clair D. Prevention and schizophrenia--the role of dietary factors. *Schizophr Bull*. 2011; 37(2): 272-83.

Mechri A, Saoud M, Khiari G, D'Amato T, Dalery J, Gaha L. Glutamatergic hypothesis of schizophrenia: clinical research studies with ketamine. *Encephale*. 2001; 27: 53-9.

Mehler-Wex C, Grunblatt E, Zeiske S, Gille G, Rausch D, Warnke A, Gerlach M. Microarray analysis reveals distinct gene expression patterns in the mouse cortex following chronic neuroleptic

and stimulant treatment: Implications for body weight changes. *J Neural Transm.* 2006; 113: 1383-93.

Meltzer HY, Horiguchi M, Massey BW. The role of serotonin in the NMDA receptor antagonist models of psychosis and cognitive impairment. *Psychopharmacology (Berl).* 2011; 213(2-3): 289-305. .

Meyer U, Feldon J. Epidemiology-driven neurodevelopmental animal models of schizophrenia. *Prog Neurobiol.* 2010; 90(3): 285-326.

Miller AL. The methylation, neurotransmitter, and antioxidant connections between folate and depression. *Altern Med Rev.* 2008; 13(3): 216-26.

Miyamoto S, Lamantia AS, Duncsn GE, Sullivan P, Gilmore JH, Lieberman JA. Recent advances in the neurobiology of schizophrenia. *Mol Interv.* 2003; 3(1): 27-39.

Muntjewerff JW, Van Der Put N, Eskes T, Ellenbroek B, Steegers E, Blom H, Zitman F. Homocysteine metabolism and B-vitamins in schizophrenic patients: low plasma folate as a possible independent risk factor for schizophrenia. *Psychiatry Res.* 2003; 121(1): 1-9.

Muntjewerff JW, Hoogendoorn ML, Kahn RS, Sinke RJ, Den Heijer M, Kluijtmann LA, Blom HJ. Hyperhomocysteinemia, methylenetetrahydrofolate reductase 677TT genotype, and the risk for schizophrenia: a Dutch population based case-control study. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2005; 135B: 69-72.

Muntjewerff JW, Kahn RS, Blom HJ, Den Heijer M. Homocysteine, methylenetetrahydrofolate reductase and risk of schizophrenia: a meta-analysis. *Mol Psychiatry.* 2006; 11: 143-9.

Neill JC, Barnes S, Cook S, Grayson B, Idris NF, McLean SL, Snigdha S, Rajagopal L, Harte MK. Animal models of cognitive dysfunction and negative symptoms of schizophrenia: focus on NMDA receptor antagonism. *Pharmacol Ther.* 2010; 128(3): 419-32.

Nisijima K, Shioda K. A rare case of neuroleptic malignant syndrome without elevated serum creatine kinase. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2014; 10: 403-7.

Ohno M, Watanabe S. Persistent increase in dopamine release following activation of metabotropic glutamate receptors in the rat nucleus accumbens. *Neurosci Lett.* 1995; 200(2): 113-6.

O'Neill MF, Shaw G. Comparison of dopamine receptor antagonists on hyperlocomotion induced by cocaine, amphetamine, MK-801 and the dopamine D1 agonist C-APB in mice. *Psychopharmacology.* 1999; 145: 237-50.

Perala J, Suvisaari J, Saarni SI, Kuopassalmi K, Isometsa E, Pirkola S, Partonen T, Tuulio-Henriksson A, Hintikka J, Kieseppa T, Harkannen T, Koskinnen S, Lonnqvist J. Lifetime prevalence of psychotic and bipolar I disorders in a general population. *Arch Gen Psychiatry.* 2007; 64: 19-28.

Petronjevic ND, Radonjic NV, Ivkovic MD, Marinkovic D, Piperski VD, Duricic BM, Paunovic VR. Plasma homocysteine levels in young male patients in the exacerbation and remission phase of schizophrenia. *ProgNeuropsychopharmacolBiol Psychiatry.* 2008; 32(8): 1921-6.

Pickard B. Progress in defining the biological causes of schizophrenia. *Expert Rev Mol Med.* 2011; 13: e25.

Pilla C, Cardozo RF, Dutra-Filho CS, Wyse AT, Wajner M, Wannmacher CM. Creatine kinase activity from rat brain is inhibited by branched-chain amino acids in vitro. *Neurochem Res.* 2003; 28(5): 675-9.

Prakabaran S, Swatton JE, Ryan MM, Huffaker SJ, Huang JT, Griffin JL, Wayland M, Freeman T, Dudbridge F, Lilley KS, Karp NA, Hester S, Tkachev D, Mimmack ML, Yolken RH, Webster MJ, Torrey EF, Bahn S. Mitochondrial dysfunction in schizophrenia: evidence for compromised brain metabolism and oxidative stress. *Mol Psychiatry.* 2004; 9: 684-97.

Prince JA, Yassin MS, Oreland L. Normalization of cytochrome-c oxidase activity in the rat brain by neuroleptics after chronic treatment with PCP or methamphetamine. *Neuropharmacology*. 1997; 36(11-12): 1665-78.

Prince JA, Blennow K, Gottfries CG, Karlsson I, Oreland L. Mitochondrial function is differentially altered in the basal ganglia of chronic schizophrenics. *Neuropsychopharmacology*. 1999; 21(3): 372-9.

Prince JA, Harro J, Blennow K, Gottfries CG, Oreland L. Putamen mitochondrial energy metabolism is highly correlated to emotional and intellectual impairment in schizophrenics. *Neuropsychopharmacology*. 2000; 22(3): 284-92.

Rezin T, Amboni G, Zugno AI, Quevedo J, Streck EL. Mitochondrial dysfunction and psychiatric disorders. *Neurochem Res*. 2009; 34(6): 1021-9.

Rodriguez JM, Miranda D, Bunout D, Ronco AM, de la Maza MP, Hirsch S. Folates Induce Colorectal Carcinoma HT29 Cell Line Proliferation Through Notch1 Signaling. *Nutr Cancer*. 2015; 67(4): 706-11.

Roffman JL, Lamberti JS, Achtyes E, Macklin EA, Galendez GC, Raeke LH, Silverstein NJ, Smoller JW, Hill M, Goff DC. Randomized multicenter investigation of folate plus vitamin B12 supplementation in schizophrenia. *JAMA Psychiatry*. 2013; 70(5): 481-9.

Rosenbaum G, Cohen BD, Luby ED, Gottlieb JS, Yelen D. Comparison of sernyl with other drugs: simulation of schizophrenic performance with sernyl, LSD-25, and amobarbital (amytal) sodium; I. Attention, motor function, and proprioception. *Arch Gen Psychiatry*. 1959; 1: 651-6.

Rosenfeld M, Brenner-Lavie H, Ari SG; Kavuchansky A, Ben-Shachar D. Perturbation in mitochondrial network dynamics and in complex I dependent cellular respiration in schizophrenia. *Biol Psychiatry*. 2011; 69(10): 980-8.

Ross CA, Margolis RL, Reading SA, Pletnikow M, Coyle JT. Neurobiology of schizophrenia. *Neuron*. 2006; 52(1): 139-53.

Rüsh N, Tebartz Van Elst L, Valerius G, Büchert M, Thiel T, Ebert D, Henning J, Olbrich HM. Neurochemical and structural correlates of executive dysfunction in schizophrenia. *Schizophr Res.* 2008; 99: 155-63.

Rustin P, Chretien D, Bourgeron T, Gerard B, Rötig A, Saudubray JM, Munnich A. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clinical Chimic Acta.* 1994; 228: 35-51.

Saedismeolia A, Djalali M, Moghandam AM, Ramezankhani O, Najmi L. Folate and vitamin B12 status in schizophrenic patients. *JRMS.* 2011; 16: 437-41.

Sarter M, Lustig C, Taylor SF. Cholinergic contributions to the cognitive symptoms of schizophrenia and the viability of cholinergic treatments. *Neuropharmacology* in press. 2010.

Schultz SH, Notth SW, Shields CG. Schizophrenia: a review. *Am Fam Physician.* 2007; 75(12): 1821-9.

Shirayama Y, Obata T, Matzuzava D, Nonaka H, Kanazawa Y, Yoshitome E, Ikehira H, Hashimoto K, Iyo M. Specific metabolites in the medial prefrontal cortex are associated with the neurocognitive deficits in schizophrenia: a preliminary study. *Neuroimage.* 2010; 49: 2783–90.

Smith AM, Picciano MF, Deering RH. Folate supplementation during lactation: maternal folate status, human milk folate content, and their relationship to infant folate status. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1983; 2: 622- 8.

Smits LJM, Essed GM. Short interpregnancy intervals and unfavourable pregnancy outcome: role of folate depletion. *Lancet.* 2001; 358: 2074-7.

Smits L, Pedersen C, Mortensen P, Van Os J. Association between short birth intervals and schizophrenia in the offspring. *Schizophr Res.* 2004; 70(1): 49-56.

Srivastava N, Bartwal MK, Dalal PK, Agarwal AK, Nag D, Srimal RC, Seth PK, Dikshit M. Nitrite content and antioxidant enzyme levels in the blood of schizophrenia patients. *Psychopharmacology (Berl)*. 2001; 158: 140-5.

Stahl SM. Novel therapeutics for depression: L-methylfolate as a trimonoamine modulator and antidepressant-augmenting agent. *CNS Spectr*. 2007; 12(10): 739-44.

Stone JM, Day F, Tsagaraki H, Valli I, McLean MA, Lythgoe DJ, O'Gorman RL, Barker GJ, McGuire PK; OASIS. Glutamate dysfunction in people with prodromal symptoms of psychosis: relationship to gray matter volume. *Biol Psychiatry*. 2009; 66: 533-9.

Streck EL, Rezin GT, Barbosa LM, Assis LC, Grandi E, Quevedo J. Effect of antipsychotics on succinate dehydrogenase and cytochrome oxidase activities in rat brain. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2007; 376(1-2): 127-33.

Su Ya, Si TM, Zhou DF, Guo CM, Wang XD, Yang Y, Shu L, Liang JH. Risperidone attenuates MK-801-induced hyperlocomotion in mice via the blockade of serotonin 5-HT 2A/2C receptors. *Eur J Pharmacol*. 2007; 564(1-3): 123-30.

Susser E, Neugbauer R, Hoek HW, Brown AS, Lin S; Labovitz D, Gorman JM. Schizophrenia after prenatal famine. Further evidence. *Arch Gen Psychiatry*. 1996; 53(1): 25-31.

Tajima K, Fernández H, López-Ibor JL, Carrasco JL, Díaz-Marsá M. Schizophrenia treatment. Critical review on the drugs and mechanisms of action of antipsychotics. *Actas Esp Psiquiatr*. 2009; 37(6): 330-42.

Tamminga CA, Holcomb HH. Phenotype of schizophrenia: a review and formulation. *Mol Psychiatry*. 2005; 10: 27-39.

Taurine R, Thome J, DuVigneau JC, Forbes-Robertson S, Yang L, Klampf K, Romanos J, Müller S, Gerlach M, Mehler-Wex C. Expression analyses of the mitochondrial complex I 75-kDa subunit in early onset schizophrenia and autism spectrum disorder: increased levels

as a potential biomarker for early onset schizophrenia. *Eur Child Adolesc Psychiatry*. 2010; 19(5): 441-8.

Théberge J, Bartha R, Drost DJ, Menon RS, Malla A, Takhar J, Neufeld RW, Rogers J, Pavlovsky W, Schaufel B, Densmore M, Al-Semaan Y, Williamson PC. Glutamate and glutamine measured with 4.0 T proton MRS in never-treated patients with schizophrenia and healthy volunteers. *Am J Psychiatry*. 2002; 159: 1944-6.

Tjiattas L, Ortiz DO, Dhivant S, Mitton K, Rogers E, Shea TB. Folate deficiency and homocysteine induce toxicity in cultured dorsal root ganglion neurons via cytosolic calcium accumulation. *Aging Cell*. 2004; 3(2): 71-6.

Tsai G, Passni LA, Slusher BS, Carter R, Baer L, Kleinman JE, Coyle JT. Abnormal excitatory neurotransmitter metabolism in schizophrenic brains. *Arch Gen Psychiatry*. 1995; 52(10): 829-36.

Valenstein M, Blow FC, Copeland LA, McCarthy JF, Zeber JE; Gillon L, Bingham CR, Stavenger T. Poor antipsychotic adherence among patients with schizophrenia: medication and patient factors. *Schizophr Bull*. 2004; 30(2): 255-64.

Verkhatsky A, Kirschhoff F. NMDA Receptors in glia. *Neuroscientist*. 2007; 13: 28-37.

Vinkers CH, Mirza NR, Olivier B, Kahn RS. The inhibitory GABA system as a therapeutic target for cognitive symptoms in schizophrenia: investigational agents in the pipeline. *Expert Opin Investig Drugs*. 2010; 19(10): 1217-33.

Volk DW, Austin MC, Pierri JN, Sampson AR, Lewis DA. Decreased glutamic acid decarboxylase 67 messenger RNA expression in a subset of prefrontal cortical γ -aminobutyric acid neurons in subjects with schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry*. 2000; 57: 237-45.

Volz HP, Rzanny R, Rössger G, Hübner G, Kreitschmann-Adermahn I, Kaiser WA, Sauer H. Decreased energy demanding processes in the frontal lobes of schizophrenics due to neuroleptics? A 31P-magneto-resonance spectroscopic study. *Psychiatry Res*. 1997; 76: 123-9.

Watanabe M, Yoshikawa M, Takeyama K, Hashimoto A, Kobayashi H, Suzuki T. Subchronic administration of ketamine decreases the mRNA expression of serine racemase in rat brain. *Tokai J Exp Clin Med.* 2010; 35(4): 137-43.

Watkins JC, Evans RH. Excitatory Amino Acid Transmitters. *Ann Rev Pharmacol Toxicol.* 1981; 21: 165-204.

Weiden PJ, Buckley PF, Grody M. Understanding and Treating “First-Episode” Schizophrenia. *Psychiatr Clin North Am.* 2007; 30: 481-510.

Werth JL, Thayer SA. Mitochondria buffer physiological calcium loads in cultured rat dorsal root ganglion neurons. *J Neurosci.* 1994; 14(1): 348-56.

Wyss M, Kaddurah-Daouk R. Creatine and creatinine metabolism. *Physiol Rev.* 2000; 80(3): 1107-1213.

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

Yang YJ, Wu PF, Long LH, Yu DF, Wu WN, Hu ZL, Fu H, Xie N, Jin Y, Ni L, Wang JZ, Wang F, Chen JG. Reversal of aging-associated hippocampal synaptic plasticity deficits by reductants via regulation of thiol redox and NMDA receptor function. *Aging Cell.* 2010; 9(5): 709-21.

Yang Y, Paspalas CD, Jin LE, Picciotto MR, Arnsten AF, Wang M. Nicotinic $\alpha 7$ receptors enhance NMDA cognitive circuits in dorsolateral prefrontal cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013; 110(29): 12078-83.

Yoshimi A, Aleksic B, Kawamura Y, Takahashi N, Yamada S, Usui H, Saito S, Ito Y, Iwata N, Inada T, Noda Y, Yamada K, Ozaki N. Gene-wide association study between the methylenetetrahydrofolate reductase gene (MTHFR) and schizophrenia in the Japanese population, with an updated meta-analysis on currently available data. *Schizophr Res.* 2010; 124: 216-22.

Zugno AI, Valvassori SS, Scherer EB, Mattos C, Matté C, Ferreira CL, Rezin GT, Wyse AT, Quevedo J, Streck EL. Na⁺,K⁺-ATPase activity in an animal model of mania. *J Neural Transm.* 2009; 116(4): 431-6.

Zugno AI, de Miranda IM, Budni J, Volpato AM, Luca RD, Deroza PF, de Oliveira MB, Heylmann AS, da Rosa FS, Wessler P, Mastella GA, Cipriano L, Quevedo J. Effect of maternal deprivation on acetylcholinesterase activity and behavioral changes on the ketamine-induced animal model of schizophrenia. *Neuroscience.* 2013; 248 C: 252-60.

Zugno AI, Chipindo HL, Volpato AM, Budni J, Steckert AV, de Oliveira MB, Heylmann AS, da Rosa Silveira F, Mastella GA, Maravai SG, Wessler PG, Binatti AR, Panizzutti B, Schuck PF, Quevedo J, Gama CS. Omega-3 prevents behavior response and brain oxidative damage in the ketamine model of schizophrenia. *Neuroscience.* 2014; 259: 223-31.

Zugno AI, Pacheco FD, Budni J, de Oliveira MB, Canever L, Heylmann AS, Wessler PG, da Rosa Silveira F, Mastella GA, Gonçalves CL, Freitas KV, de Castro AA, Streck EL, Quevedo J. Maternal deprivation disrupts mitochondrial energy homeostasis in the brain of rats subjected to ketamine-induced schizophrenia. *Metab Brain Dis.* 2015.